SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN EXPERIMENTELL MIT TRYPANOSOMA CONGOLENSE INFIZIERTEN RINDERN VERSCHIEDENER RASSEN

von Gudula Willberg aus Bochum

München 1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544308_0025

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin und
Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN EXPERIMENTELL MIT TRYPANOSOMA CONGOLENSE INFIZIERTEN RINDERN VERSCHIEDENER RASSEN

Inaugural Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians Universität München

von
Gudula Willberg
aus
Bochum

München 1983

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. G. Terplan

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

Korreferent: Prof. Dr. H. Mahnel

Tag der Promotion: 25. Februar 1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. Einleitung..... 1

II. Immunologische Aspekte bei afrikanischen Trypanosomeninfektionen und Trypanotoleranzphänomen (anhand der Literatur..... 2

III. Eigene Untersuchungen..... 24

A. Material und Methoden..... 24

B. Ergebnisse..... 35

1. Charakterisierung der Antigenpräparationen über SDS- Elektrophoresen..... 35

2. Serologische Untersuchungen..... 37

a) IFAT..... 37

b) ELISA..... 45

c) Immunpräzipitation 52

d) Gesamteiweiß- Bestimmung..... 54

e) Serumeiweißfraktionen..... 55

IV. Diskussion..... 59

V. Zusammenfassung - Summary..... 71

VI. Literaturverzeichnis..... 73

I. Einleitung

Die Rindertrypanosomiasis (Nagana) stellt derzeit ein vorherrschendes Problem für die Nutztierhaltung im tropischen Afrika dar. Trypanosoma congolense ist neben T.brucei und T.vivax ihr wichtigster Erreger.

Der Infektionsverlauf ist abhängig von der Virulenz der Erreger und der Empfänglichkeit der Wirtstiere. Rinderrassen, die aus Europa, Asien oder Amerika importiert wurden, erkranken überwiegend akut; starke Parasitämie- und Fieberschübe sowie schwere Anämien bedingen eine hohe Sterberate und erhebliche wirtschaftliche Verluste. Dagegen verläuft die Krankheit bei Wildwiederkäuern und eingeborenen, buckellosen Rinderrassen (N'dama, West African Shorthorn) meist chronisch und endet selten tödlich. Diese reduzierte Empfänglichkeit oder erhöhte Widerstandsfähigkeit bestimmter Rassen gegen pathogene Trypanosomen wird als Trypanotoleranz bezeichnet. Bisher ist ungeklärt, welche angeborenen oder erworbenen Mechanismen diesem Phänomen zugrundeliegen.

In der vorliegenden Arbeit wurden serologische Untersuchungen an nur wenigen Vertretern trypanotoleranter und anfälliger Rinderrassen und an Kreuzungstieren im Verlauf experimenteller Infektionen mit T.congolense durchgeführt. Mit Hilfe von IFAT, ELISA und Immunpräzipitation wurden humorale Immunantworten der Tiere unter Verwendung von korpuskulärem und löslichem T.congolense-Antigen zu vergleichen versucht.

II. Immunologische Aspekte bei afrikanischen Trypanosomeninfektionen und Trypanotoleranzphänomen (anhand der Literatur)

- Antigene und Antigenvarianz

Charakteristikum afrikanischer Trypanosomeninfektionen ist das Auftreten von Parasitämiewellen, in denen nacheinander Trypanosomenpopulationen mit unterschiedlichen Antigeneigenschaften (Varianten) erscheinen. Eine erste Beschreibung dieser Antigenvarianz findet sich bei FRANKE (1905). Die veränderlichen oder variantenspezifischen Antigene (VSA's) sind bei allen Blutstromformen salivarischer Trypanosomen außerhalb der Plasmamembran in einem 12-15 nm dicken "surface- coat" lokalisiert (VICKERMAN,1969). Als Überzug über die gesamte Oberfläche lebender Trypanosomen bedeckt der coat alle darunterliegenden,nicht variantenspezifischen, somatischen Endo- Antigene (common, stable, bound, internal, homogenate antigens), die erst nach Trypanolyse freigesetzt werden.

Common antigens bleiben als überwiegend essentielle Strukturbestandteile der Parasiten während des gesamten Infektionsverlaufs und in allen Entwicklungsstadien unverändert. Sie kommen bei verschiedenen varianten Populationen, Trypanosomenstämmen und -spezies gemeinsam vor (DESOWITZ,1970; SEED,1974; CLARKSON,1976; TERRY,1976; DOYLE,1977).
So fand GRAY (1961) im Serum von Zebus, die mit T.vivax infiziert waren, präzipitierende Antikörper gegen lösliche Antigene, die auch bei T.b.brucei und T.b.gambiense vorkamen. HÖRCHNER, BOFENSCHEN und ZANDER (1979) und BOFENSCHEN (1979) wiesen mit Immunfluoreszenz- und Peroxidasetests kreuzreagierende somatische Antigene bei T.brucei, T.vivax und T.congolense nach.
Über den chemischen Aufbau der Endoantigene ist wenig bekannt. Wahrscheinlich sind sie identisch mit zytoplasmatischen Enzymen, Nukleoproteinen und Strukturproteinen der Zellmembran (BROWN und WILLIAMSON,1962; SEED,1974; DE RAADT,1974). Gegen common antigens gerichtete Antikörper besitzen weder protektive noch agglutinierende Eigenschaften (SEED,1972; TERRY,1976). Damit scheinen sie für die immunologische Kontrolle der Trypanosomen durch ihre Wirte von untergeordneter Bedeutung zu sein. Für die Serodiagnostik

stellen sie bei Berücksichtigung der geringen Artspezifität gute und brauchbare Antigene dar (WILSON und CUNNINGHAM,1971).

Variantenspezifische Oberflächenantigene induzieren im Wirt neben agglutinierenden und präzipitierenden Antikörpern eine vollständige protektive Immunität (SEED,1972), sind aber wegen ihrer großen Spezifität für routinemäßige serologische Untersuchungen nicht geeignet. Wie alle Oberflächenantigene lassen sie sich experimentell mit Agglutinationstests differenzieren (CUNNINGHAM und VICKERMAN, 1962; GRAY,1965). Agglutination mit verschiedenen Lektinen gibt Hinweise auf die Anordnung von Zuckerketten im surface- coat (RAUTENBERG, REINWALD, RISSE,1980).

Obwohl der coat 10% des Trockengewichts von Trypanosomen ausmacht (PEARSON und Mitarb.,1981), blieben Versuche zur Isolierung der VSA's über lange Zeit auf instabile und heterogene Antigenpräparationen beschränkt, die keine chemische Charakterisierung erlaubten (BROWN und WILLIAMSON,1962; SEED,1972; LANHAM und TAYLOR,1972). Eine große Schwierigkeit bei der Reindarstellung von VSA's aus Trypanosomenhomogenaten stellen endogene Proteasen dar, die bei Zerstörung der Trypanosomen freiwerden und die Oberflächenantigene abbauen. An radioaktiv markierten und gereinigten VSA's von T. brucei machte CROSS (1975) die ersten Strukturanalysen.

Der coat besteht nach heutiger Vorstellung aus einer Vielzahl nahezu einheitlicher Glykoproteine, die über der Plasmamembran eine dichte, monomolekulare Schicht bilden. Jedem antigenetisch homogenen Trypanosomenklon läßt sich ein spezielles, prädominierendes Glykoprotein zuordnen, dessen Molekulargewicht bei T.brucei zwischen 60000 und 65000 Dalton liegt (CROSS,1975). Ein Glykoprotein von T.brucei besteht aus ca.600 Aminosäuren und 20 Monosaccharidresten, deren jeweilige Komposition die Antigenspezifität bestimmt.

Trotz variierender Molekülzusammensetzung ist die räumliche Konformation der Oberflächenantigene relativ konstant. Trypsinierung führt bei allen T.brucei- VSA's zu Spaltung in ein langes, freies N- terminales und ein kurzes, hydrophiles C- terminales Fragment, das als Restpeptid in der Zellmembran verbleibt (CROSS und Mitarb., 1980). Cross (1977) vermutet, daß die C- Termini der VSA's über

Ionenbindungen an Phospholipid- Rezeptoren außen an der Zellmembran angeheftet sind. Durchdringung der Lipiddoppelmembran scheint wegen der Hydrophilität nicht möglich. Sequenzanalysen der N-terminalen Aminosäuren ergaben keinerlei Homologien zwischen verschiedenen VSA's (CROSS,1975 und 1977; BRIDGEN und CROSS,1976); demnach enthalten die nach außen gerichteten Molekülenden ausschließlich variable Regionen. Dagegen existieren kreuzreagierende Determinanten in Kohlenhydratgruppen des C- terminalen Teilstücks (BARBETT und Mitarb.,1981; CROSS,1980); bei lebenden Trypanosomen sind diese inneren VSA- Regionen Antikörpern nicht zugänglich (CROSS,1980). MATTHYSSENS und Mitarb.(1981) führen die Herkunft dieser nicht variablen VSA- Bezirke auf ein gemeinsames, ancestrales Gen aller Trypanosomen einer Spezies zurück.

Statt Reinigung aus Trypanosomenextrakten- wie bei T.brucei- wurden für die sehr proteasesensiblen T.congolense 2 Verfahren entwickelt, die eine Ablösung der VSA's von der Plasmamembran ohne Zerstörung der Parasiten ermöglichen (REINWALD, RAUTENBERG und RISSE,1979 und 1981). Da VSA's als lösliches Exoantigen im Serum infizierter Tiere nachweisbar sind (WEITZ,1960; ALLSOPP, NJOGU und HUMPHREYES,1971), können die Oberflächenantigene nur sehr lokker an der Plasmamembran verhaftet sein. Sie lassen sich daher durch einfaches Schütteln abtrennen (REINWALD, RAUTENBERG, RISSE, 1979). Eine bessere Ausbeute von 2 mg reinen Antigens pro 10^{10} Trypanosomen erreichten REINWALD, RAUTENBERG und RISSE (1981) durch Herauslösen der VSA's aus der Membran mit dem hydrophoben Lösungsmittel Dioxan. Wahrscheinlich ist der coat von T.congolense in den Phospholipiden der Plasmamembran über die hydrophoben C- terminalen Enden seiner Glykoproteine verankert.

In verschiedenen Stämmen von T.congolense wurden für die VSA's Molekulargewichte von 53000 (RICHARDS und Mitarb.,1981) bzw. 57000 (REINWALD, RAUTENBERG und RISSE,1979) ermittelt. Bei isoelektrischer Fokussierung (IEF) antigenetisch homogener VSA's findet eine Auftrennung in 3 Banden statt. Die 3 IEF- Komponenten reflektieren eine Mikroheterogenität der VSA- Moleküle, die nach RICHARDS und Mitarb.(1981) auf Unterschiede in der Aminosäurese-

quenz, nach REINWALD, RAUTENBERG und RISSE (1981) auf solche in Kohlenhydratgruppen zurückzuführen ist. RAUTENBERG, REINWALD und RISSE (1981) machen Neuraminsäurereste für die Ladungsunterschiede verantwortlich; zusätzlich wiesen sie eine Molekulargewichtsheterogenität im Kohlenhydratanteil nach. Auf die Existenz übereinstimmender räumlicher Anordnungen in den VSA's von T.congolense wie von T.brucei läßt die gleichartige selektive Spaltbarkeit mit Trypsin nahe dem carboxyterminalen Ende schließen.

Die Funktionen der VSA's sind größtenteils ungeklärt. Sie sind verantwortlich für die Infektiosität und Pathogenität eines Trypanosomenstammes und induzieren durch ihre hohe Immunogenität viele spezifische Antikörper. Nach CROSS (1977) schützen die VSA's die Trypanosomen vor Phagozytose durch Makrophagen und wehren unspezifische, lytische Serumfaktoren ab. Trypsinierte Trypanosomen werden von normalem Serum lysiert. Außerdem verhindert der surface- coat Interaktionen zwischen Komponenten des Immunsystems und nicht varianten Zellmembranbestandteilen. Die Bindung von Antikörpern an VSA's vermittelt aber auch Komplementlyse der Parasiten, meßbar durch sinkende Trypanosomenzahlen im Blut nach einem Parasitämiepeak. Dezimierung der meisten individuellen Trypanosomen verhindert einen zu schnellen Tod des Wirts und ist dadurch für das Überleben der Gesamtpopulation von Vorteil. Eine latente Infektion gibt den Parasiten Zeit,zu proliferieren und von einem Vektor aufgenommen zu werden. Ihrer vollständigen Ausrottung wirken sie mit Hilfe der Antigenvariation entgegen; ständig neue Trypanosomenpopulationen lassen die vom Wirt gebildeten Antikörper unwirksam werden, verhindern so die Ausbildung einer wirksamen Sekundärantwort und führen zu immunologischer Erschöpfung.

Unter Verwendung monoklonaler Antikörper bewiesen PEARSON und Mitarb.(1981), daß nicht alle Antigendeterminanten der VSA's in vivo auf der äußeren Trypanosomenoberfläche exponiert sind. Abspaltung der VSA's macht sie dem Immunsystem des Wirts zugänglich. Dies führt zunächst zu polyklonaler Lymphozytenaktivierung und sekundär zu kompensatorischer "down- regulation", die sich als Immunsuppression äußert. Die Anzahl der möglichen Varianten, die aus einem Trypanosom entstehen können ("clone specific metacyclic

serotypes" nach CROSS,1980) ist unbekannt. Wahrscheinlich ist der einzige limitierende Faktor die Länge der Überlebenszeit des Wirts (GRAY,1967). Bei Rindern erscheinen nach T.vivax- Infektion alle 2-5 Tage neue Varianten (JONES und CLARKSON,1974).

Als mögliche Mechanismen der Antigenvarianz stehen sich spontane Zufallsmutation und kontrollierte Expression von VSA's aus einem umfangreichen genetischen Programm gegenüber. Die nie völlig einheitliche Zusammensetzung einer klonierten Variantenpopulation aus je einem prädominierenden und einigen Neben- VSA's kann durch einen Zufallsprozeß entstehen, in dessen Verlauf einige Antigene besonders häufig synthetisiert werden (VAN MEIRVENNE,1975; RITZ, 1914). Es kann sich darin auch die Fähigkeit jedes einzelnen Trypanosoms widerspiegeln, nach genetisch vorgegebenem Muster viele Glykoproteine zu bilden (BORST und Mitarb.,1980).
Zufällig erscheint das zweimalige Auftreten des gleichen VSA's im Verlauf einer bovinen T.brucei- Infektion trotz Anwesenheit hoher spezifischer Antikörpertiter (NANTULYA und Mitarb.,1979). Für einen gesteuerten Prozeß spricht dagegen die Fähigkeit verschiedener Trypanosomenpopulationen, nach zyklischer Übertragung ähnliche Glykoproteine großer struktureller Vielfalt zu synthetisieren. Nach Infektion unterschiedlicher Wirte mit derselben Trypanosomenpopulation läßt sich sogar für T.brucei (GRAY,1975) und für T.congolense (WILSON und CUNNINGHAM,1972) die Sequenz der Varianten in etwa vorhersehen (GRAY und LUCKINS,1976; TERRY,1976; HUDSON,TAYLOR und ELCE,1980; CROSS und Mitarb.,1980). KOSINSKI (1980) bestätigt mit einer Computeranalyse, daß durch zufällige Bildung nicht die in der Literatur beschriebene "variant orderliness" produziert werden kann.
Einer genetischen Steuerung bedarf wohl auch die Rückumwandlung jeder Variante eines T.brucei-Stamms zu einem "basic antigen" im Vektor (BROOM und BROWN,1940; HUDSON, TAYLOR und ELCE,1980; CROSS und Mitarb.,1980; HAJDUK und VICKERMAN,1981). Nach Aufnahme durch die Tsetsefliege verlieren die Trypanosomen zunächst ihren coat und damit ihre Infektiosität. Der schon in den Speicheldrüsen der Fliege neusynthetisierte coat (HUDSON, TAYLOR und ELCE,1980) enthält unabhängig von den 2-3 Wochen früher aufgenommenen Blutstromvarianten ein für jeden Trypanosomenklon reproduzierbares

und einheitliches Antigen. HAJDUK und VICKERMAN (1981) beschreiben seine Identität mit dem VSA der ersten Trypanosomenpopulation im Blut des nächsten Wirts, während HUDSON,TAYLOR und ELCE (1980) in der ersten Parasitämie 3 prädominierende VSA's unterscheiden konnten.Nach CROSS (1980) lenkt die zyklische Übertragung durch die Glossine einen hypothetischen Genselektormechanismus um zu einem jedem Stamm vorgegebenen Startpunkt. Für T.congolense wird von UILENBERG und GIRET (1972) ein basic antigen nachgewiesen; SCHLÄPPI und JENNI (1977) bezweifeln aber seine Existenz.

Die Antigenvarianz wird vermutlich unter Antikörperbeteiligung ausgelöst, da sie im immuninkompetenten Wirt nicht stattfindet (LUCKINS,1972 a; HUDSON und Mitarb.,1976; VAN MEIRVENNE,1975). Dabei begünstigen vor allem niedrige IgM- Konzentrationen die Bildung neuer VSA's (TAKAYANAGI und ENRIQUEZ,1973; HUDSON und TERRY, 1979). Da die großmolekularen IgM schlecht ins Gewebe eindringen können, nimmt CROSS (1978) eine extravasale Änderung des surface-coat an, nach der die neugebildeten Varianten wieder in die Blutbahn zurückkehren.
Antikörper können die Varianz selektiv beeinflussen. Dabei werden neue Glykoproteine entsprechend vorgegebener, innerer Programmierung der Trypanosomen synthetisiert; es überleben nur die Parasiten, die für schon gebildete Antikörper keine passenden Determinanten an ihrer Oberfläche tragen. Die andere Möglichkeit ist ein induktiver Einfluß. Die Bindung zwischen Antikörper und VSA wirkt als Signal für die Umstellung der trypanosomalen Proteinsynthese auf ein neues Glykoprotein, solange die Antikörperkonzentration nicht ausreicht, um die Trypanosomen zu zerstören. CROSS (1980) hält das Zusammenwirken induktiver und selektiver Einflüsse für wahrscheinlich.

JENNI (1977) stellte Antigenvarianz in metazyklischen T.brucei schon 36 Stunden nach Tsetsestich fest. Innerhalb dieses Zeitraums konnte eine Immunantwort noch nicht an der Neusynthese von Proteinen beteiligt gewesen sein. Als Auslösemechanismus wird eine Ladungsänderung der Membran als Folge des dramatischen Umgebungswechsels diskutiert.

Zur weiteren Aufklärung der Antigenvarianz werden Genanalysen

beitragen, die schon von BORST und Mitarb.(1980) und von AGABIAN und Mitarb.(1980) begonnen wurden.

- Humorale Immunantwort

Immunglobuline

In der Auseinandersetzung eines Organismus mit Antigenen lassen sich Primär- und Sekundärantwort des humoralen Immunsystems unterscheiden. Erstmaliger Kontakt mit einem Antigen führt nach mehrtägiger Latenz zu einem Anstieg der IgM- Titer, dem zeitlich verzögert eine IgG- Zubildung folgt. Während die IgM- Konzentrationen ,je nach Immunogen, innerhalb von 2-3 Wochen wieder abfallen, bleiben die IgG- Titer Wochen bis Monate erhöht, um erst dann zu Normalwerten zurückzukehren. Bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen ist die Latenzphase stark verkürzt. Die Frühphase der Infektion ist wieder durch einen kurzzeitigen,etwas lebhafteren IgM-Ausstoß gekennzeichnet. Im Vergleich zur Primärantwort sind aber besonders die IgG- Spiegel stärker und längerfristig erhöht; auch haben diese Antikörper eine größere Bindungsfähigkeit für das Antigen.

Abweichend von diesem vereinfacht dargestellten "normalen" Ablauf nehmen bei der afrikanischen Trypanosomiasis die IgM- Konzentrationen außergewöhnlich stark zu und bleiben auch bei latenten Infektionen dauerhaft hoch. Eine wirksame Sekundärantwort scheint völlig zu fehlen.
Werden Zebus aus tsetsefreien in enzootische Nagana gebiete gebracht und dort einer natürlichen Infektion mit T.brucei,T.vivax und T.congolense ausgesetzt, steigen ihre IgM- Werte innerhalb von 2 Wochen um das 2-9-fache an und bleiben für mehrere Monate auf diesem Niveau, während sich die IgG- Serumkonzentrationen höchstens verdoppeln (LUCKINS,1972 b). Entsprechende Werte ließen sich nach intravenöser Erstinfektion von Zebus mit T.congolense und T.brucei ermitteln. Erst nach Behandlung sanken die IgM innerhalb von 25 Tagen auf Präinfektionswerte zurück (LUCKINS,1976). Bei schwarzbunten Rindern nahmen die IgM- Konzentrationen über 200 Tage nach Infektion mit T.brucei, T.congolense oder T.vivax fortwährend zu (LUCKINS und MEHLITZ,1976). In Kälbern führte eine

latente Infektion mit T.vivax ab dem 10.Tag p.i. zu einer 20- fachen Vermehrung der IgM; 4 Wochen nach Berenilbehandlung wurden die Ausgangswerte wieder erreicht. Für IgG wurde ab dem 65.-75. Tag p.i. maximal Konzentrationsverdopplung gemessen (CLARKSON, PENHALE und MCKENNA,1975). Nach LUCKINS und MEHLITZ (1976) ist der Abfall der Serum- IgM- Konzentration von allen serologischen Parametern der einzige verläßliche Indikator für eine erfolgreiche Parasitenelimination. KOBAYASHI und TIZARD (1976) bestimmten bei T. congolense- infizierten Kälbern in den ersten 3 Wochen p.i. einen 6-24- fachen IgM- Anstieg; ab der 5. Woche fielen die IgM- Werte langsam ab, um in der 15. Woche noch in 5- bis 10- facher Ausgangskonzentration vorzuliegen. Die IgG_1 erreichten in 7 Wochen p.i. zweifache Präinfektionskonzentrationen, während die IgG_2 in diesem Zeitraum im wesentlichen unverändert blieben. NIELSEN und Mitarb. (1978) fanden nach experimenteller Infektion von Kälbern mit T.congolense bei gleichbleibenden IgG- Werten eine Korrelation von IgM- Anstieg und Anzahl der Trypanosomen im Blut.

Dagegen registrierten LUCKINS und MEHLITZ (1978) nur bei der Hälfte aller untersuchten, parasitologisch positiven Zebus und N'damas erhöhte IgM- Werte; eine Rasseabhängigkeit der IgM- Konzentrationen lag nicht vor. In neueren Untersuchungen an Holstein-Friesian Ochsen fehlten nach T.congolense- Infektion sogar überhaupt signifikante IgM- Veränderungen (TABEL und Mitarb.,1981). IgG_1- Werte fielen schwach ab, IgG_2- Konzentrationen nahmen wenig zu. Neben völlig fehlender Makroglobulinämie waren die Immunglobulinveränderungen in diesem Experiment also allgemein undramatisch. Vereinzelte Messungen normaler IgM- Konzentrationen trotz aktiver Infektionen werden auch von CLARKSON,PENHALE und MCKENNA (1975) und LUCKINS und MEHLITZ (1976) beschrieben.
Nimmt man für T.congolense einen gesteigerten Katabolismus der Immunglobuline an (NIELSEN und Mitarb.,1978), kann in jedem Fall eine erhöhte IgM- Synthese vorliegen; teilweise reicht sie allerdings gerade aus, um ein Abfallen der Werte zu verhindern.

Die Untersuchungen zeigen, daß eine IgM- Bestimmung (Radiale Immundiffusion) als screening- Verfahren zur Nagana- Diagnose ,wie sie bei der menschlichen Schlafkrankheit eingesetzt wird (CUNNING-

HAM,1967), unzuverlässig ist (CLARKSON, PENHALE, MCKENNA,1975).

Nach MAKELA (1969) begünstigt eine hohe Dichte gleichartiger Antigene speziell die IgM- Produktion. Die coat- Antigene der salivarischen Trypanosomen erfüllen diese Bedingung und gelten daher als Stimulans für die übermäßige Bildung von IgM (SEED und Mitarb.,1969; SEED,1972). Durch die variierenden Antigene werden zudem ununterbrochen neue Primärantworten ausgelöst, die zu einer IgM- Kumulation führen (SEED,1972; DE RAADT,1974).

Die IgM stellen vorwiegend agglutinierende Antikörper dar (SEED und Mitarb.,1969). Sie haben protektive (TAKAYANAGI und ENRIQUEZ, 1973; SEED,1972; LUCKINS,1974) und neutralisierende Qualitäten mit einem Aktivitätsmaximum um den 17.-22. Tag p.i. (SEED und Mitarb., 1969). MUSOKE und Mitarb. (1981) machen die IgM hauptverantwortlich für die Zerstörung und Elimination erstmalig auftretender Trypanosomenvarianten. Durch Induktion neuer Varianten ("Variantenformation") sind sie vermutlich am Entstehen der Parasitämiewellen beteiligt (TAKAYANAGI und ENRIQUEZ,1973; SEED,1972 und 1977; LUCKINS,1974).

Die IgG werden vor allem gegen common antigens gebildet (DE RAADT, 1974). Sie haben präzipitierende und in späterer Infektion variantenspezifisch neutralisierende und agglutinierende Eigenschaften und besitzen Fähigkeiten zur passiven Protektion infizierter Mäuse (SEED,1977). IgG's sichern die Wirtstiere ab gegen das Wiedererscheinen einer früheren Variante. Durch ihre geringe Größe sind sie außerdem in der Lage, extravaskulär Trypanosomen zu binden.

Nach TERRY (1976) besteht eine Wechselwirkung zwischen T.brucei und humoralem Immunsystem. Dabei führt die Agglutination von variantenspezifischem IgM und Trypanosomen zu Komplementlyse; bei der anschließenden Phagozytose von Trypanosomenresten dienen VSA's und VSA- Antikörperkomplexe als Opsonine. Nach LUMSDEN und HERBERT (1967) erfolgt eine aktive Einverleibung durch Makrophagen sogar nur in Anwesenheit von homologem, varianten Antiserum. So werden die meisten im Blut zirkulierenden Trypanosomen lysiert, während Gewebsformen von IgM's nicht erreicht werden. Bis die verzögert gebildeten IgG in gewebswirksamen Konzentrationen vorlie-

gen, haben die extravasalen Trypanosomen schon neue VSA's synthetisiert und werden von den IgG nicht mehr erkannt.

"Cryptic infections" mit extravasalem Vorkommen von T.congolense werden von FIENNES (1952) beschrieben. Später wurde der Aufenthaltsort der T.congolense- "Gewebsformen" auf kleinste Kapillaren lokalisiert (LOSOS und Mitarb.,1973).

Die Spezifität der jeweiligen Immunglobulinklassen für trypanosomale Antigene läßt sich- außer mit den eigentlichen serologischen Verfahren- in Agglutinationstests (SEED und Mitarb.,1969; TAKAYANAGI und ENRIQUEZ,1973), Protektionstests (SEED,1972; LUCKINS,1974), Präzipitationstests (GRAY,1960) und in Absorptionsversuchen nachweisen.
MUSOKE und Mitarb.(1981) zeigten durch Absorption von Seren T.brucei- infizierter Rinder mit multiplen VSA's, daß in den ersten 3 Wochen der Infektion mehr als 85% der gebildeten IgM und IgG spezifisch waren. Auch HEIDRICH-JOSWIG und HÖRCHNER (1981) stellten nach Absorption boviner Seren mit Extraktantigen verminderte IgM- und IgG- Werte fest, während nach HOUBA und ALLISON (1966) die IgM- Konzentration durch Absorption nicht reduziert wurde. Da vergleichende Versuche durch die Variation in Antigen und Antikörpern erschwert sind, kann eine unvollständige Absorption durch ungünstige Verwendung weniger Varianten hervorgerufen werden (TERRY,1976) Es wird jedoch mehrfach beschrieben, daß ein großer Teil der bei Trypanosomiasis gebildeten Antikörper gegen andere als trypanosomale Antigene gerichtet ist. FREEMAN und Mitarb. (1970) bestimmten bei T.brucei- infizierten Rhesusaffen den Anteil spezifischer Antikörper am IgG- Anstieg mit weniger als 5%. NEAL, GARNHAM und COHEN (1969) beschrieben entsprechendes für IgM.

Als Ursache für die Bildung unspezifischer Antikörper wird polyklonale B- Zell- Stimulation durch ein von Trypanosomen freigesetztes, unbekanntes Mitogen angenommen (GOODWIN,1970; GREENWOOD, 1974; MURRAY und Mitarb.,1974; HUDSON und Mitarb.,1976). ESURUOSO (1956) macht in vitro freie Fettsäuren aus Trypanosomenautolysaten für die Plasmazellhyperplasie verantwortlich.

Ergebnis der spezifischen und unspezifischen Aktivierung der B -

Zellen ist ihre fortschreitende Erschöpfung mit zunehmender funktioneller Entleerung (HUDSON und Mitarb.,1976). Schließlich wird ein Stadium von Immunsuppression erreicht, das ein weiteres Charakteristikum latenter Trypanosomeninfektionen ist und wesentlich die Virulenz eines Trypanosomenstamms mitbestimmt (SACKS und Mitarb.,1980). TERRY und Mitarb.(1973) nehmen an, daß Trypanosomen direkt B-T- Zell- Interaktionen so beeinflussen, daß der Wechsel von IgM- zu IgG- Produktion verhindert wird. MACKENZIE, BOREHAM und FACER (1973) vermuten eine Zerstörung von T- Suppressorzellen, so daß die B- Zellen ungehemmt Antikörper produzieren.

Die unspezifischen Antikörper gehören überwiegend der Immunglobulinklasse M an und gelten als heterophile Antikörper (HOUBA,BROWN und ALLISON,1969; TABEL und Mitarb.,1981), als Autoantikörper oder als M- Antiglobuline (MANSFIELD und KREIER,1972). MUSOKE und Mitarb.(1981) bestimmten bei boviner T.brucei- Infektion einen An - stieg von SRBC- Agglutininen; sie erklärten die Zunahme der heterophilen Antikörper mit der ausgedehnten Kreuzreaktivität der vielen, bei Trypanolyse freiwerdenden Antigene und nicht mit unspezifischer Stimulation von B- Zellklonen. MANSFIELD und KREIER (1972) konnten dagegen in T.congolense- infizierten Kaninchen bei den Autoantikörpern gegen normales Gewebe keine Kreuzreaktionen mit Trypanosomenantigenen finden.

Die humorale Immunantwort bei Trypanosomeninfektion hat sicherlich eine unbestrittene, wenn auch teilweise unklare Bedeutung für die Pathogenese der Erkrankung. Durch die hohe IgM- Konzentration kommt es über eine erhöhte Blutviskosität zu Zirkulationsstörungen (BOREHAM und FACER,1975). Das Auftreten abgelöster Trypanosomenantigene führt bei passiver Adsorption an Erythrozyten zur Komplementlyse und damit zu einer hämolytischen Anämie, über die Bildung von Immunkomplexen zu Erkrankungen wie Glomerulonephritis und Niereninsuffizienz (HOLMES und MAMO,1975; BOREHAM und KIMBER,1970; GOODWIN und GUY,1973). Komplementaktivierung und Thrombozytenaggregation bedingen Freisetzung vasoaktiver Amine (BOREHAM,1968); erhöhte Gefäßpermeabilität und Thrombosen sind die Folge.

Serumproteine

Entsprechend der starken Antikörperbildung nimmt bei latenter Trypanosomeninfektion im allgemeinen die γ- Globulinfraktion des Serums zu (DESOWITZ,1959; CLARKSON,1968; WELLDE und Mitarb.,1974; LUCKINS,1975; VERMA und GAUTAM,1977; VALLI und Mitarb.,1980), während die Albumine ab dem 10. (GOODWIN und GUY,1973) oder 12. Tag p.i. (TABEL, LOSOS und MAXIE,1980) abfallen. CLARKSON (1968) stellte in T.vivax- infizierten Schafen zusätzlich reduziertes Plasmazellvolumen und einen Anstieg des Plasmavolumens bei gleichbleibendem totalen Blutvolumen fest. Dies sah er als Hinweis darauf, daß die vermehrten γ- Globuline bei Trypanosomiasis als Plasmavolumenexpander agieren, so daß der relative Konzentrationsabfall anderer Serumproteine auf eine Verdünnung des Bluts zurückzuführen ist.

WELLDE und Mitarb. (1974) fanden dagegen bei Hereford- Rindern in den ersten 5 Wochen nach T.congolense- Infektion einen gleichzeitigen Abfall von Albumin und γ-Globulin; erst anschließend stiegen die γ- Globulinkonzentrationen langsam über die Präinfektionswerte an, während die Albumine niedrig blieben. Vergleichbare Untersuchungen machte DESOWITZ (1960) bei wildlebenden Gazellen mit T.b.brucei- Infektion. Die initiale γ- Globulinabnahme wird mit dem Verbrauch von Antikörpern erklärt; auch gesteigerter Globulinabbau (JENNINGS und Mitarb.,1973) oder verkürzte Halbwertszeit der Globuline (NIELSEN und Mitarb.,1978) können die Ursache sein. Mit dem Latentwerden der Infektion ab etwa der 5. Woche überwiegt schließlich die Zubildung von Antikörpern; es resultiert ein γ- Globulinanstieg. In T.brucei- infizierten Kaninchen stiegen die γ- Globuline schon ab dem 25. Tag p.i. an (GOODWIN und GUY,1973).

Die α- Globuline bleiben bei Trypanosomeninfektion meist unverändert (CLARKSON,1968; LUCKINS,1975). Vereinzelt wird ein leichter Abfall bei T.evansi- infizierten Büffeln (VERMA und GAUTAM,1977) oder ein Anstieg bei neugeborenen Kälbern nach T.congolense- Infektion (VALLI und Mitarb.,1980) beschrieben.

Widersprüchlicher sind die Mitteilungen über β- Globulinveränderungen. Während in T.congolense- infizierten neugeborenen oder

6 Monate alten Kälbern die $ß_2$-Globuline gleichblieben oder abfielen (VALLI und Mitarb.,1980) und eine T.vivax- Infektion in Schafen zu relativer Abnahme von ß- Globulinen führte (CLARKSON,1968), stiegen die Konzentrationen bei experimentell mit T.vivax, T.brucei und T.congolense infizierten Zebus stark an (LUCKINS,1975). Dasselbe berichtete DESOWITZ (1960) von Gazellen.
Allgemein haben Rinder aus tsetsefreien Gebieten niedrigere ß-Globulinwerte und höhere Albuminwerte als solche aus Tsetse-Gebieten (GIDEL,1962).
Der Komplementkomponente C_3 dürfte ein wesentlicher Einfluß auf die ß- Globulinveränderungen zukommen (KOBAYASHI und TIZARD,1976; MUSOKE und BARBET,1977; NIELSEN und Mitarb.,1978).

Gesamteiweißwerte bleiben entweder unverändert (LUCKINS,1975; VERMA und GAUTAM,1977) oder fallen in den ersten 5- 7 Wochen der Infektion auf bis zu 66% der Kontrolltiere ab (TABEL, LOSOS und MAXIE,1980; WELLDE und Mitarb.,1974; VALLI und Mitarb.,1980). Danach kehren sie langsam zur Norm zurück (WELLDE und Mitarb., 1974). Diese späte Stabilität der Serumproteine geht nach WELLDE und Mitarb.(1974) auf Kosten der Gewebsproteine und hemmt die Gewichtszunahme.
Im Gegensatz zu allen anderen Untersuchern fanden EDWARDS, JUDD und SQUIRE(1956) bei Ziegen nach T.b.brucei- Infektion keinerlei signifikante Serumproteinveränderungen.

- Serodiagnostik

Trypanosomenspezifische Antikörper können qualitativ mit einer Vielzahl serologischer Methoden bestimmt werden, von denen der Immunfluoreszenztest und neuerdings auch der Enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA) für die Serodiagnostik die größte Bedeutung haben.
Beim bevorzugt angewandten indirekten Fluoreszenz- Antikörper-Test (IFAT) wird die Bindung spezifischer Serumantikörper an "whole parasite antigen"(AMBROISE- THOMAS,1976) durch anschließend zugesetztes Fluoreszein- Isothiocyanat (FITC)- konjugiertes

Antispeziesglobulin sichtbar gemacht. Je nach Fc- Stück- Spezifität der markierten Antiglobuline lassen sich hierbei Antikörper der verschiedenen Immunglobulinklassen (IgG, IgM,..) unterscheiden. Für die Diagnostik der Rindertrypanosomiasis wurde die IFAT-Technik von WILSON, CUNNINGHAM und KIMBER (1966) eingeführt.
Die Qualität des Tests schwankt je nach Art und Behandlung des verwendeten Antigens. In den meisten älteren Untersuchungen wurden als Antigen trypanosomenhaltige Blutausstriche verwendet, die entweder erst nach Lufttrocknung oder gar nicht fixiert wurden. Das Trocknen verändert unfixierte Trypanosomen, so daß sich ihre Morphologie verändert und Oberflächenantigene zumindest teilweise abgelöst oder abgebaut werden (MEHLITZ,1975; NANTULYA und DOYLE, 1977); entsprechend unspezifisch werden die Testergebnisse.
WILSON, CUNNINGHAM und KIMBER (1967) sowie WILSON (1969) stellten mit dem IFAT nur solche Antikörper fest, die gegen gemeinsame Antigene von T.brucei, T.congolense und T.vivax gerichtet waren (common antigens).
POLITZAR (1974) fand nach Misch- oder Einzelinfektion von Rindern mit den 3 Trypanosomenspezies, daß die Antikörpertiter gegen homologes Antigen (0,3% Essigsäure- fixierte Ausstriche) kaum höher waren als die gegen heterologes; eine speziesspezifische Diagnose der Trypanosomiasis schien ihm mit dem IFAT daher nicht möglich. Dagegen stellten WILSON und CUNNINGHAM (1971) mit unfixierten Blutausstrichen als Antigen zwischen homologen und heterologen serologischen Reaktionen eine Titerdifferenz von 5 Stufen fest; auch bei BOFENSCHEN (1979) waren es mit gleichartigem Antigen 1-3, bei SCHINDLER (1972) 4- 5 Titerstufen (Essigsäurefixation).
Übereinstimmend mit MEHLITZ und DEINDL (1972) beurteilten diese Untersucher den IFAT als ausreichend spezifisch für eine Artendiagnose, wenngleich auch bei ihnen heterologe Titer immer auftraten. Stärkste Antigenverwandtschaft zeigten hierbei T.brucei und T.vivax, während Kreuzreaktionen mit T.congolense relativ gering waren (MEHLITZ und DEINDL,1972; SCHINDLER,1972; MEHLITZ,1975).
Wurde T.vivax- Antigen mit Aceton- Methanol fixiert, reagierte es nicht mit Antikörpern gegen heterologe Trypanosomenspezies oder andere Protozoen (PLATT und ADAMS,1976). MEHLITZ und DEINDL (1972) beschrieben präinfektiöse IFAT- Titer, hervorgerufen durch T. theileri.

Neuere Techniken ermöglichen inzwischen die Konservierung der VSA's auf der Trypanosomenoberfläche und damit hoch spezifische Aussagen; dabei werden in Puffer suspendierte, lebende Trypanosomen schonend fixiert, bevor sie an einer festen Phase antrocknen.
NANTULYA und DOYLE (1977) erhielten auf diese Weise mit Formalin oder Glutaraldehyd als Fixationsmittel bei T.brucei gleichermaßen Morphologie und immunologische Spezifität; es gelang ihnen im direkten und indirekten IFAT die Differenzierung verschiedener Varianten. STANLEY, HONIGBERG und CUNNINGHAM (1978) konnten die Trypsinierung von T.brucei aus Blut- und Kulturformen im IFAT verfolgen.

Der IFAT erfaßt mit Ausnahme der ersten 6- 17 (MEHLITZ, 1975) bzw. 13- 16 Tage (PLATT und ADAMS, 1976) nach Erscheinen der ersten Trypanosomen im Blut zuverlässig alle Infektionsfälle mit positivem Parasitenbefund. Darüber hinaus bleibt er in parasitenfreien Intervallen und bei chronischen Erkrankungen positiv. Da auch nach Selbstheilung oder Behandlung eine lange Antikörperpersistenz beobachtet wird, lassen sich Parasitenträger mit dem IFAT nicht selektieren.
WIESENHÜTTER (1969) infizierte 4 Zeburinder experimentell mit T. congolense; ab dem 14. Tag p.i. waren im IFAT Titer von 1 : 40 meßbar, ab dem 34. Tag p.i. Maximaltiter bis 1 : 1280. Kontinuierlich hohe Titer gingen einem letalen Infektionsausgang voraus. Latente Infektionen waren dagegen charakterisiert durch starke Titerschwankungen mit zeitweiliger Erniedrigung auf 1 : 40 und teilweise erneute Anstiege auf 1 : 640 noch 7 Monate p.i.. Berenilbehandlung führte zum Abfallen der Antikörpertiter innerhalb von 40- 80 Tagen.
Nach Infektion von Zebus mit T.vivax und T.brucei konnte WIESENHÜTTER (1972) eine direkte Korrelation zwischen serologischem Titer und Parasitämiehöhe herstellen. LÖTZSCH und DEINDL (1974) sowie MEHLITZ (1975) verneinten dagegen eine solche Korrelation. WILSON und CUNNINGHAM (1972) wiesen in T.congolense- infizierten Zebus ab dem 10.- 20. Tag p.i. positive IFAT- Titer nach. Ein Tier, das nach Reversion seiner Trypanosomen zu einem früheren Antigentyp die Parasiten aus seiner Zirkulation eliminierte,

hatte noch 200 Tage nach dem letzten Trypanosomennachweis im Blut erhöhte Antikörpertiter.
Bei Schwarzbunten, die mit T.congolense, T.brucei oder T.vivax infiziert waren (MEHLITZ,1975), blieben die Titer ab dem 14.- 28. Tag p.i. für durchschnittlich 145 Tage positiv. Selbstheilung führte erst nach über 200 Tagen zu einem Absinken der Antikörpertiter im IFAT. Bei MEHLITZ und DEINDL (1972) wurden die fluoreszierenden Antikörper von Berenilbehandlung ebensowenig beeinflußt. Übereinstimmend beschrieben WERY und Mitarb.(1970) für die menschliche Schlafkrankheit eine Rückkehr der IFAT- Titer zu Normalwerten erst 3 Monate bis über 2 Jahre nach Behandlung.
Bei T.vivax- infizierten Kälbern wurden Maximaltiter durchschnittlich 23, im Einzelfall erst mehr als 100 Tage nach der ersten Parasitämie erreicht (PLATT und ADAMS,1976).

Der IFAT ist damit bei schonender Antigenpräparation ein spezifisches Diagnosehilfsmittel zur Erkennung frischer und latenter Trypanosomeninfektionen. Die serologische Bestätigung eines Behandlungserfolgs scheint mit diesem Test nicht möglich zu sein.
Es sollten wegen der langen Antikörperpersistenz sicherheitshalber alle Tiere mit positivem IFAT- Titer als potentielles Trypanosomenreservoir betrachtet werden (ZWART und Mitarb.,1973).

Der ELISA wurde 1972 von ENGVALL und PERLMANN (1972) entwickelt. Erstmals zum serologischen Nachweis afrikanischer und amerikanischer Trypanosomeninfektionen wendeten ihn VOLLER und Mitarb. (1975) und VOLLER, BIDWELL, BARTLETT (1975) an.

Das Testprinzip gleicht dem IFAT, wobei jedoch lösliche Antigene Anwendung finden. Nach passiver Adsorption des Antigens an eine feste Phase (i.a. Polystyrol) werden schrittweise Serum, enzymmarkiertes Antispeziesglobulin und ein geeignetes Substrat zugegeben. Der Substratumsatz, eine mehr oder weniger intensive Farbreaktion, gilt als Maß für die Konzentration spezifischer Antikörper im Serum.
Mit den bisher als Antigen verwendeten, unfraktionierten Trypanosomenhomogenaten ließen sich Antikörper gegen die verschiedenen pathogenen Trypanosomenspezies im allgemeinen nicht unter-

scheiden (LUCKINS,1977; RUITENBERG und BUYS,1977; LUCKINS und MEHLITZ,1978).
LUCKINS (1977) erklärt die starke Kreuzreaktivität zwischen T. vivax, T.brucei und T.congolense damit, daß im ELISA Antikörper gegen common antigens nachgewiesen werden. Bei den von ihm untersuchten Einzel- und Mischinfektionen von Rindern hatte T.congolense im Vergleich mit T.brucei und T.vivax die schlechtesten Antigeneigenschaften; die spezifischen Antikörpertiter blieben am niedrigsten.
BOFENSCHEN (1979) ermittelte eine Titerdifferenz von 1- 3 Stufen zwischen homologen und heterologen Reaktionen der 3 Trypanosomenspezies und bewertete dies als ausreichend für eine speziesspezifische Diagnose. Von LUCKINS und MEHLITZ (1978) wurden entsprechend bovine Mischinfektionen mit T.brucei, T.vivax und T.congolense nur vollständig erfaßt, wenn Antigene aller verursachenden Spezies ausgetestet wurden.
Weitere Kreuzreaktionen traten auf mit T.cruzi (VOLLER, BIDWELL und BARTLETT,1975 ; VOLLER und Mitarb.,1977) und Leishmanien (VOLLER, BIDWELL und BARTLETT,1975 ; RUITENBERG und BUYS,1977), nicht aber mit T.theileri , Theilerien, Babesien, Anaplasmen (LUCKINS,1977), Plasmodien, Toxoplasmen, Schistosomen und Echinokokken (RUITENBERG und BUYS,1977).
In Empfindlichkeit und diagnostischer Effizienz ist der ELISA dem IFAT vergleichbar bis überlegen, wobei der Mikro- ELISA bessere Resultate bringt als die Makromethode (VOLLER und Mitarb., 1975 und 1976; RUITENBERG und BUYS,1977; RUITENBERG und VAN KNAPEN,1977; LUCKINS und MEHLITZ,1978; LUCKINS, GRAY und RAE,1978).

LUCKINS (1977) untersuchte im ELISA die Antikörperantwort von über 300 Schwarzbunten und Zebus auf natürliche Trypanosomeninfektion. Die Titer stiegen ab dem 7.- 14.Tag p.i. an; dann wurden starke individuelle Variationen und Fluktuationen im Infektionsverlauf deutlich.
Nach experimenteller Infektion von Kaninchen mit T.brucei oder T. rhodesiense wurden spezifische Antikörper im ELISA ab 8 Tage p.i. nachweisbar (RUITENBERG und BUYS,1977), nach Infektion mit T.evansi ab 15 Tage p.i. (LUCKINS, GRAY und RAE,1978).

Wie der IFAT ermöglicht auch der ELISA keine Unterscheidung zwischen frischer und latenter Infektion und Rekonvaleszenz, da die Antikörper erst Monate nach Parasitenelimination wieder abfallen (LUCKINS, GRAY und RAE,1978).
Nach Behandlung persistierten in Rindern spezifische Antikörper gegen T.brucei, T.congolense oder T.vivax 70-80 Tage (LUCKINS,1977), in T.evansi- infizierten Kaninchen über 100 Tage lang (LUCKINS, GRAY und RAE,1978). Bei T.vivax- infizierten Kälbern waren die ELISA- Titer noch 6 Monate nach Berenilgabe erhöht (VOLLER, BIDWELL und BARTLETT,1976).

Vorzüge des ELISA sind bei photometrischer Auswertung seine große Objektivität, bei visuellem Ablesen seine leichte Durchführbarkeit ohne teure Spezialausrüstung. Gemeinsam mit dem IFAT ist er für seroepidemiologische Massenerhebungen von großem Nutzen.
LUCKINS und MEHLITZ (1972) beurteilen IFAT wie ELISA als sehr viel zuverlässigere Untersuchungsverfahren bei Trypanosomeninfektionen als eine quantitative IgM- Bestimmung.

- Trypanotoleranz

Der Begriff "Trypanotoleranz" beschreibt nicht das Ausbleiben einer Immunantwort nach Trypanosomeninfektion, sondern bezeichnet die Überlebensfähigkeit bestimmter westafrikanischer Rinderrassen in Tsetsegebieten ihrer Heimat, in denen Zebus und andere importierte Rinder dem Infektionsdruck erliegen (GRIFFIN und ALLONBY, 1979; MURRAY und MORRISON,1979). Ebenso trypanosomenresistent oder - unempfänglich sind in endemischen Gebieten einheimische Schaf - und Ziegenrassen (GRIFFIN und ALLONBY,1979) und Wildtiere (ASHCROFT, BURTT und FAIRBAIRN,1959).

Anhand klinischer Parameter wurden N'damas und Zebus aus tsetsefreien Gebieten nach natürlicher Trypanosomeninfektion miteinander verglichen (CHANDLER, 1952; DESOWITZ,1959; ROBERTS und GRAY,1973; MURRAY und MORRISON,1979). Beide Tiergruppen zeigten anfänglich vergleichbare Präpatenz, Anämie, Gewichtsverluste, Kälber auch Wachstumsverzögerungen und mangelnde sexuelle Reife (STEPHEN,1966); im späteren Infektionsverlauf zeichneten sich die N'damas ohne Be-

handlung durch niedrigere und kürzere Parasitämien, schwächere Anämien, weniger Reinfektionen, häufigere vollständige klinische Genesung und weniger Todesfälle aus (MURRAY und MORRISON,1979).

DESOWITZ (1959) stellte zudem mit einem Respirationstest bei N'damas mehr spezifische Antikörper als bei Zebus fest und beobachtete bei den resistenteren Tieren postinfektiös einen zusätzlichen γ - Globulinpeak. Er machte die Ausprägung trypanotoleranter Eigen - schaften abhängig von Antigenstimuli im Kälberalter; Jungtiere überstehen Trypanosomeninfektionen generell besser als Adulte derselben Rasse (FIENNES,1970).

BERNARD, HAASE und GUIDOT (1980) fanden bei der Antikörpermessung mit IFAT und ELISA keine signifikanten Unterschiede zwischen infizierten Zebus und buckellosen Rindern.

Kreuzungstiere aus West African Shorthorns und Zebus behielten trypanotolerante Eigenschaften bei (STEWART,1951). Zumindest eine teilweise dominante Vererbung der Resistenz bestätigte LETENNEUR (1978) mit N'dama- Jersey- Mischlingen. CHANDLER (1952) stellte fest, daß Zebu- N'dama- Kreuzungstiere in ihrer Empfänglichkeit für T.vivax und T.congolense genau zwischen reinrassigen N'damas und Zebus lagen. Auch bei Schafen und Ziegen nahm die "Toleranz" von eingeborenen Rassen über Hybridtiere zu exotischen Rassen hin zu (GRIFFIN und ALLONBY,1979). MORTELMANNS und KAGERUKA (1976) berichten dagegen von sehr schlechten Resistenzergebnissen nach Kreuzung toleranter N'dama- und Shorthornrinder mit wenig resistenten Rassen.

So bleibt bisher unklar, ob Trypanotoleranz genetisch verankert ist oder in der Auseinandersetzung mit den Parasiten erworben wird. Erschwert wird die Unterscheidung angeborener Eigenschaften von einer besonders effektiven Immunabwehr durch den großen Einfluß von Umweltfaktoren. Schlechte Haltungsbedingungen bewirken auch bei "toleranten" Rindern eine Abnahme der Widerstandsfähig - keit gegen Trypanosomen (GODFREY, LEACH und KILLICK- KENDRICK, 1964; MORTELMANNS und KAGERUKA,1976). Hierzu gehören schlechte Ernährung, schwere Arbeit, Ortswechsel, andere Erkrankungen (Verwurmungen) oder ähnliche Stressfaktoren. Die Trypanotoleranz wird

weiter beeinflußt durch Geschlecht, Gravidität, Alter des ersten Trypanosomenkontakts und Kolostrumaufnahme. Nach MURRAY und MORRISON (1979) wird den Rindern eine bestimmte Empfänglichkeit angeboren, die aber durch wiederholte Auseinandersetzung der Tiere mit einer bestimmten Trypanosomenpopulation in einem bestimmten Gebiet vermindert wird.
Angesichts dieser starken Relativität lehnt STEPHEN (1966) die Propagierung der nach seinen Erfahrungen unrentablen Zwergrinderrassen in Westafrika ab. ROBERTS und GRAY (1973) schätzen dagegen den Wert von N'damas und Dahomeys als Fleischproduzenten in Tsetsegebieten sehr hoch ein; auch als Zugtiere sind sie überdurchschnittlich leistungsfähig (STARKEY,1982).

Als Ergänzung zu den oft zufälligen Feldstudien wurden standardisierte Modellversuche an trypanosomenempfänglichen (A/J, CFLP) und nicht empfänglichen (C 57 Bl) Mäusestämmen zur Klärung der Trypanotoleranzfrage herangezogen. Bei der Interpretation dieser Versuche darf jedoch nicht von vergleichbaren Verhältnissen bei Mäusen und Rindern ausgegangen werden.
Durch Kreuzung von Tieren des A/J- Stamms mit C 57 Bl- Mäusen wurde die Empfänglichkeit für Trypanosomeninfektion auf die F1-Hybride vererbt und verhielt sich auch bei Rückkreuzungsversuchen entsprechend den Mendelschen Gesetzen (MORRISON und MURRAY,1979).

Andere Untersuchungen ließen auf aktive Beteiligung des Immunsystems an der "Toleranz" schließen.
T.congolense- Infektion führte bei C 57 Bl-Mäusen und bei CFLP-Mäusen anfänglich zu gleicher Parasitämie; allein bei den resistenten Tieren sanken ab dem 8. Tag p.i. die Parasitenzahlen im Blut, und die hämatologischen Werte normalisierten sich langsam. Präinfektiöse Immunsuppression durch Ganzkörperbestrahlung mit 450 Rad, Cyclophosphamidgaben oder Splenektomie veränderte den Infektionsverlauf bei CFLP- Mäusen nicht; bei C 57 Bl- Mäusen nahm dagegen die Infektion nun vergleichbar fatale Ausmaße an wie in dem empfänglichen Stamm (WHITELAW und JENNINGS,1978). Umgekehrt führte Immunstimulation (z.B. mit BCG) vor Trypanosomeninokulation bei empfänglichen A/J- Mäusen zu Reduktion und Ver-

zögerung der Parasitämie und erhöhter Überlebenszeit der Tiere; auch die klinischen Erscheinungen waren nicht mehr stärker als die von C 57 Bl- Tieren (MORRISON und MURRAY, 1979).
SELKIRK und SACKS (1980) korrelierten die Virulenz von T.brucei in Mäusen mit der Suppression der IgM- Antwort durch die Parasiten. Auch die gegenüber dem A/J- Stamm geringere Sensitivität von C 57 Bl- Tieren zu unspezifischer polyklonaler Aktivierung und zu Immunsuppression mag geringere Empfänglichkeit bedingen (MORRISON und MURRAY,1979).

Die umstrittene Heretabilität der Trypanotoleranz erlaubt nur Hypothesen über ihre ursächlichen Mechanismen.
Diskutiert wird vor allem eine besondere Aktivität unspezifischer oder spezifischer Abwehrfaktoren der resistenten Rassen gegenüber Trypanosomen (TERRY, 1976). Zur unspezifischen Abwehr zählen Makrophagen und Blutproteine wie Komplement und Properdin.
Bei T.vivax- Infektion der Baumwollratte wurden trypanolytische Serumfaktoren beschrieben, die unabhängig vom Antigenstimulus als natürliche Antikörper Trypanosomen agglutinieren (TERRY,1976).
Andererseits kann die Bindung bestimmter Serumproteine an Rezeptoren der Trypanosomenoberfläche als Antikörper- protecting-factor den Angriff zytolytischer Antikörper verhindern. Eine "antigenic competition" zwischen Serumproteinen und Trypanosomenantigenen um Makrophagenbindungsstellen ist ebenfalls vorstellbar.
Vielleicht fehlen den Trypanosomen im Blut trypanotoleranter Tiere essentielle Nahrungsbestandteile. Eine Korrelation bestimmter Hb- Typen mit "Toleranzeigenschaften" wurde inzwischen widerlegt (BANGHAM und BLUMBERG,1958). Die Assoziation mit bestimmten Histokompatibilitätstypen ist noch fragwürdig.
Nachgewiesen ist, daß N'damas mehr Leukozyten, besonders eosinophile, als Zebus haben. Außerdem sind sie genügsamer im Fressen und sehr hitze- und feuchtetolerant (PAGOT,1974; MORTELMANNS und KAGERUKA,1976). Dies wirkt sicher unterstützend auf jede Krankheitsresistenz. Daß der Geruch oder die Farbe ihrer Haut sie für Tsetsefliegen wenig attraktiv macht, scheint zweifelhaft (TERRY, 1976).

Mit Ausnahme von DESOWITZ (1959) und BERNARD, HAASE und GUIDOT (1980) liegen mir keine vergleichenden Untersuchungen zu spezifischen humoralen oder zellulären Immunreaktionen trypanotoleranter und empfänglicher Rinder vor. DESOWITZ (1959) sah die Natur der Resistenz in einer besonders wirksamen sekundären Immunantwort. Tolerante Rinder können dadurch Dauer und Höhe der Parasitämie limitieren (WEITZ,1970; DARGIE und Mitarb.,1974) und die Parasiten schneller eliminieren als empfängliche Tiere. Möglich erscheint eine Begrenzung der Antigenvariation in den resistenten Rindern, ebenso das Erkennen besonderer trypanosomaler Antigene, das die Parasiten verwundbarer werden läßt.

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methoden

Als Infektionsmaterial diente ein Stamm von Trypanosoma congolense (Uhaya EATRO 291), der seit 1966 - unterbrochen von gelegentlichen Mäuse- und Rinderpassagen - im Institut als Stabilat in flüssigem Stickstoff gehalten wird.

Die Anzüchtung und Vermehrung der Trypanosomen erfolgten in weiblichen, weißen NMRI- Mäusen (30-35 g) und weißen Ratten beiderlei Geschlechts (180-200 g). Die Tiere stammten aus institutseigener Zucht; sie wurden in Makrolonkäfigen gehalten und erhielten Altrominstandarddiät und Wasser ad libitum.

Alle Mäuse wurden mindestens 12 Stunden vor der Trypanosomeninokulation einer Ganzkörper- Röntgenbestrahlung von 800 Rad unterzogen. Die Bestrahlungsdaten waren folgende: Gerät Kristalloflex der Fa. Siemens und Halske; Röhrenspannung 60 kV, Stromstärke 30 mA, Filterung 0,16 mm Cu, Bestrahlungsdauer 10 min; die Oberflächendosisleistung betrug im Zentrum des Nutzstrahlenbündels bei einem Fokus-Objektabstand (FOA) von 25 cm 75 Rad/min, in der Peripherie bei einem FOA von 27,5 cm 27,5 Rad/min.

Nach intraperitonealer Beimpfung mit dem Stabilat 26/I wurden die Mäuse täglich durch mikroskopische Untersuchung des Schwanzblutes auf das Vorhandensein von Trypanosomen untersucht. Zum Auszählen der Parasiten in einer Thomakammer verdünnte ich das Blut mit 0,9%-iger NaCl im Verhältnis 1 : 100. War eine Parasitämie von etwa 10^8 T.congolense/ml in etwa 4-5 Tagen nach Beimpfung mit dem Stabilat erreicht, wurden die Mäuse in Chloroformnarkose nach Thoraxeröffnung durch Herzpunktion entblutet. Durch Überimpfung des entnommenen Zitratbluts erfolgten in dreitägigen Abständen alle weiteren Passagen zum Halten des Trypanosomenstammes.

Zur Gewinnung größerer Antigenmengen wurden Ratten verwendet. Hier führte die intraperitoneale Injektion von 10^8 Trypanosomen (= 1ml hochparasitämisches Mäuseblut) schon innerhalb von 3 Tagen zu einer Parasitämie von 2-3 x 10^8 T.congolense/ml. Die Tiere wurden am 3.Tag p.i. ebenfalls in Chloroformnarkose durch offene Herzpunktion entblutet. Die Ausbeute betrug 6-8 ml Blut/ Ratte.

Zum späteren Einstellen von IFAT und ELISA benötigte ich ein positives Referenzserum. Zu dessen Gewinnung infizierte ich ein männliches Kaninchen mit 3 x 10^6 T.congolense (Stabilat 26/I) i.v.und entnahm am 14. und 21. Tag p.i. Blut aus der Ohrrandvene.

Insgesamt untersuchte ich im Verlauf meiner Arbeit die Seren von 14 Rindern verschiedener Rassen sowie unterschiedlichen Geschlechts und Alters, die sich teilweise schon einmal zumindest mit Stoffwechselprodukten von T.congolense auseinandergesetzt hatten (Reinfektion) oder erstmals experimentell infiziert wurden (Tab. 1).

Gruppe	Rind	Rasse	Alter (Jahre)	Geschlecht	Infektionsstatus
1	S1	Dt.	2	m	Reinfektion
	S2	Schwarz-	2	w	Reinfektion
	S3	bunte	1/2	m	Erstinfektion
	S4		1/2	m	Kontrolle
2	D1	Dahomeys	4	m	Reinfektion
	D2		4	w	Reinfektion
	D3		6	w	Erstinfektion
	D4		3	w	Kontrolle
3	F1	Fleckvieh	1/2	m	Erstinfektion
	F2		1/2	m	Erstinfektion
	F3		1/2	m	Kontrolle
4	K1	N'dama-	2	m	Erstinfektion
	K2	Fleckvieh-	2	m	Erstinfektion
	K3	Kreuzungen	2	w	Kontrolle

Tab. 1: Aufstellung der verwendeten Versuchsrinder nach Rasse, Alter, Geschlecht und Infektionsstatus

Die Tiere wurden unter einheitlichen Bedingungen im Anbindestall gehalten.
In 2 aufeinanderfolgenden Versuchen wurden zunächst die Rinder der Gruppe 1 und 2, später die Tiere der Gruppe 3 und 4 mit einer blutzellfreien Suspension von 1,5 oder 2 x 10^6 Trypanosomen in 2 ml PBS- Puffer subcutan in Schulterhöhe infiziert.
Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich im ersten Fall auf 6, bei den Gruppen 3 und 4 auf 3 Monate. In den ersten 10 Tagen p.i.

wurde den Rindern täglich Blut aus der V.jugularis entnommen, anschließend 3 x wöchentlich.
Nach Gerinnung des Blutes wurden die Seren 10 min. bei 1300 g abzentrifugiert und in kleinen Portionen in Eppendorf- tubes bei - 25°C bis zu ihrer Untersuchung eingefroren.

Eine Behandlung mit 7 mg/kg Berenil® (Diminazenaceturat) erfolgte bei den Rindern S2 und D2 am 44.Tag p.i., bei S1, S3, D1 und D3 am 101. Tag p.i.. Der Behandlungserfolg wurde am 190. Tag p.i. überprüft durch jeweilige Beimpfung von 10 Mäusen mit 0,4 ml Blut eines jeden Rindes.
Um die tatsächlich noch bestehende Infektion mit Sicherheit festzustellen, entnahm ich von jedem infizierten Rind der Gruppen 1 und 2 11-18 Tage p.i. und 60-70 Tage p.i. je 0,4 ml Blut und injizierte dies bestrahlten Mäusen i.p.. Da die Mäuse nach 5-10 Tagen in jedem Falle eine starke Parasitämie zeigten, entblutete ich sie und stellte aus ihrem Blut die Stabilate $S1_1$, $S1_2$, $S2_1$, usw. her. Hierzu wurden gleiche Volumina hochparasitämischen Mäusebluts und eines Gemischs aus 30% Glyzerin und 70% physiologischer NaCl miteinander in Stabilatampullen vermengt und im Kühlschrank auf 4°C vorgekühlt. Eine weitere Temperatursenkung um 1°C/min. bis auf -40°C erfolgte im Flüssigeis - Methanolbad unter manueller Zugabe von Flüssigeis. Anschließend wurden die Stabilate bei -80°C im Tiefkühlschrank oder bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Trypanosomales Antigen wurde für den ELISA und den Ouchterlony - Test in löslicher Form, für den IFAT in korpuskulärer Form hergestellt.
Die Trypanosomen wurden nach der Methode von LANHAM und GODFREY (1970) mittels Säulenchromatographie von den Blutbestandteilen getrennt. Auf Grund von Ladungsunterschieden ihrer Zelloberflächen werden die Blutzellen in der Säule gebunden, während die Trypanosomen leicht retardiert durchlaufen.
Als Trennmedium diente DE 52 (Diethylaminomethyl- Zellulose), ein vorgequollener Anionenaustauscher der Fa. Whatman, England. Die Zellulose wurde mit einem Phosphatpuffer- Glukose- Gemisch (PSG

pH 8) äquilibriert. Hierzu wurden 200 g Zellulose in 1200 ml PSG suspendiert, unter vorsichtigem Rühren mit 1%-iger H_3PO_4 ein pH von 8 eingestellt und nach Absetzenlassen der Zellulosepartikel über den Zeitraum t= 1,8 x h (t= Zeit, h= Höhe des Austauschervolumens) der Überstand mit den sogenannten "fines" (besonders leichte Zelluloseteilchen) abgegossen. Die Zellulose wurde dann im ursprünglichen Volumen frischen Puffers erneut aufgeschwemmt und der gleiche Vorgang des Absetzenlassens und Abgießens zweimal wiederholt. Nach dem letzten Dekantieren wurde die abgesetzte Zellulosesuspension mit gleichen Teilen PSG aufgerührt und in LKB- Säulen von 6 cm Durchmesser auf eine Gelbetthöhe von 5 cm aufgefüllt. Reine Seide stellte die untere Säulenbegrenzung dar. Dem Packen der Säulen folgten ihr Durchspülen mit ca. dreifachem Säulenvolumen PSG und die nochmalige Kontrolle des Eluats auf pH 8.

Alle Aufarbeitungsschritte des trypanosomenhaltigen Rattenbluts wurden unter Eiskühlung durchgeführt.
Das Blut wurde sofort nach der Entnahme mit PSG- Citrat- Puffer (9 Teile PSG und 1 Teil 3,8%-iges Na-Citrat) im Verhältnis 1 : 3 verdünnt und auf die Säule gegeben. Eine optimale Ausnutzung der Säulenkapazität und damit eine möglichst quantitative Trypanosomenausbeute ergab sich bei einem Verhältnis von 1 ml aufgetragenen Originalbluts auf 8 ml gepacktes Säulenvolumen. Bei einem Durchlaufvolumen von ca. 30 Tropfen/min. wurde die Säule 3-4 Stunden lang mit 0,5% BSA- PSG gespült, bis sich 80-90% der aufgetragenen Trypanosomen im blutzellfreien Eluat wiederfanden. Das BSA diente hierbei zur Verbesserung der Trypanosomenmotilität. Anschließend wurde das Eluat zur Entfernung der Serumproteine 3 x gewaschen. Dies geschah jeweils durch 20- minütige Kühlzentrifugation bei 2500 g (Universal/K 25 - Zentrifuge der Fa. Hettich), Resuspension des Trypanosomenrückstands in frischem PSG und erneute Zentrifugation. Dann wurden die Parasiten in der Thomakammer gezählt und mit PSG auf eine Dichte von 5 x 10^8/ml eingestellt. Die weitere Verarbeitung der Trypanosomen richtete sich nach der Art des serologischen Tests, für den das Antigen bestimmt war.

Zur Gewinnung von korpuskulärem Antigen wurden die gewaschenen T. congolense nach der Methode von NANTULYA und DOYLE (1977) fixiert.

Hierzu wurden 1 Teil (0,5 ml) der Trypanosomensuspension und 4 Teile (2 ml) Glutaraldehyd (0,05% in PBS) bei Zimmertemperatur 60 sec lang inkubiert. Es folgten dreimaliges Waschen in PBS durch Abzentrifugieren bei 2000 g für 5 min und erneutes Aufschwemmen in frischem Puffer. Nach dem letzten Waschgang stellte ich die Trypanosomendichte mit PBS so ein, daß das Auftropfen der Suspension auf einen Objektträger im Lichtmikroskop bei 40-er Vergrößerung etwa 30 T.congolense pro Blickfeld sichtbar werden ließ. Mit dieser Verdünnung wurden spezielle IFAT- Objektträger (Firmen Fresenius oder Hölzel) beschichtet, die über Nacht an der Luft trockneten. Dann wurden die Objektträger zusammen mit Kieselgel luftdicht in Plastiktüten eingeschweißt und bei -25°C bis zum Gebrauch aufgehoben.
Als IFAT- Antigen dienten sowohl die zur Infektion der Rinder verwendeten, direkt aus dem Stabilat 26/I vermehrten T.congolense ("Impftrypanosomen") vor und nach Trypsinierung als auch die am 11.-18. bzw. 60.-70. Tag p.i. aus den Rindern der Gruppen 1 und 2 in Mäuse überimpften T.congolense nach Vereinigung zu einem pool ("Trypanosomenpool").

Lösliches Antigen stellte ich durch Extraktion oder Trypsinierung der Parasiten her.
Zur Gewinnung des Extraktantigens wurden die gewaschenen Trypanosomen in ml- Portionen mit je 5 x 10^8 T.congolense zunächst eingefroren, wieder aufgetaut und dann in Anlehnung an die Methode von HUGHES und BALFOUR (1981) mit gleichem Volumen 1%-igen n- Octyl-gluco-pyranosids (Fa. Merck) versetzt und im Eiswasserbad 3 x 10 sec mit einer Ausgangsleistung von 50 Watt beschallt (Sonifier^R B12, Fa.Branson, Sonic Power Company). Nach Zusatz eines Tropfens 1%-igen Natriumazids (NaN_3) wurden die löslichen Moleküle über Nacht bei 4°C unter Rühren extrahiert. Der unlösliche Rückstand wurde 1 Stunde mit 48000 g in der Superspeed RC2-B- Sorvall- Zentrifuge abzentrifugiert. Nach vorsichtigem Abheben des Überstands mit dem löslichen Antigen wurde dessen Eiweißgehalt mit der Methode von Folin- Ciocalteau, modifiziert nach LOWRY und Mitarb.(1951), mit Phenolreagenz der Fa. Merck bestimmt. 10^9 T.congolense ergaben eine Ausbeute von bis zu 10 mg lösliches Protein. Das Extraktantigen wurde nach mindestens vierstündiger Gefriertrocknung

(Beta A- Lyophilisator der Fa. Christ) in zugeschweißten Glasampullen bei 4°C gelagert.

Zur Gewinnung eines "Trypsinierungsproduktes" von T.congolense - Oberflächenantigenen nach RAUTENBERG, REINWALD und RISSE (1980) wurden 5 x 10^8 gewaschene Trypanosomen in 4,5 ml PSG resuspendiert und mit 0,5 ml Trypsin (400 µg/ml PSG, Typ XI, DPCC-treated, Fa. Sigma) 10 min bei 30°C unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 0,55 ml Sojabohnen- Trypsininhibitor (800 µg/ml PSG, Fa. Sigma) und durch anschließendes Abzentrifugieren der an der Oberfläche angedauten Trypanosomen mit 2500 g für 5 min. Vor Lyophilisierung des abgenommenen Überstands wurde sein Proteingehalt mit der Kupfer- Folin- Reaktion auf ca. 0,2 mg/ml eingestellt.

Zur Charakterisierung der enthaltenen Proteine wurden von der "heilen " Trypanosomensuspension, vom trypsinierten Rückstand nach Resuspension in 4 ml PSG und vom Überstand je 400 µl abgenommen, mit 100 µl SDS- Probenpuffer 2 min aufgekocht und die so denaturierten Proben 3 x 10 sec bei 50 Watt beschallt.
Dr. Reinwald und Prof.Dr. Risse des Instituts für Veterinärbiochemie der FU Berlin bestimmten freundlicherweise die Molekulargewichte der Probenproteine mit einer SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese. Sie verwendeten dazu das diskontinuierliche Puffersystem nach LÄMMLI (1970) und Acrylamid von 3% im Sammelgel und einem linearen Gradienten von 5-17% im Trenngel. Elektrophorese erfolgte bei 150 V konstanter Spannung für 4-5 Stunden. Die Gele wurden in 12,5%-iger Trichloressigsäure fixiert; zur Proteinfärbung diente 0,1%-iges Coomassie- Blue R 250 in 50% Methanol/ 10% Essigsäure. Das Entfärbebad enthielt 50% Methanol und 10% Essigsäure.

Den indirekten Fluoreszenz- Antikörpertest (IFAT) führte ich nach einer Modifikation von CAMARGO (1966) durch.
Zum Verdünnen von Antiserum und Konjugat und zum Waschen wurde PBS- Puffer verwendet. Als Konjugat diente RAB/IgM (Fc) der Firma Nordic, Niederlande, bzw. RAB/IgG (heavy and light chains) der Fa. Cappel, USA. In Vorversuchen hatte sich eine Konjugatverdünnung von 1 : 20 als optimal herausgestellt.

Der Test umfaßte die folgenden Arbeitsschritte:
- Verdünnen der zu untersuchenden Seren 1 : 16 bis 1 : 512 in Mikrotiterplatten (Fa. Greiner),
- Auftragen der Serumverdünnungen (je 10 µl) auf die antigenbeschichteten Reaktionsfelder der IFAT- Objektträger,
- Inkubation 45 min bei 37°C in der feuchten Kammer,
- Waschen der Objektträger 3 x 5 min und Trocknen mit Filterpapier,
- Auftragen der Konjugatverdünnung (je 10 µl), der zur Gegenfärbung Evansblue in einer Verdünnung von 1:10000 zugesetzt war,
- Inkubation 45 min bei 37°C in der feuchten Kammer,
- Waschen der Objektträger 3 x 5 min und Trocknen mit Filterpapier,
- Eindeckeln der Objektträger mit einem Glyzerin- PBS- Gemisch (pH 7,6 - 8).

Danach erfolgte die Auswertung der Präparate mit einem Fluoreszenzmikroskop ("Orthoplan" der Fa. Leitz, Filterkombination 3) im Auflicht bei 6,3 x 40-facher Vergrößerung. Als positive Reaktion galt jedes Auftreten gelbgrüner Fluoreszenz auf den Parasitenoberflächen.

Den Enzyme- linked Immunosorbent Assay (ELISA) wandte ich als indirekte Methode, modifiziert nach VOLLER und Mitarb. (1975) sowie nach AMBROISE- THOMAS und DESGEORGE (1978), an.
Als feste Phase verwendete ich Polystyrol- Microplates mit 96 Flachbodenvertiefungen der Fa. Dynatech (M 129 A). Die Konzentrationseinstellung der Antigene vor ihrer Adsorption an die Microplates erfolgte mit coating- buffer (c.b.= Karbonat- Bikarbonat-Puffer, pH 9,6); die Antiseren wurden verdünnt mit 0,5% HSA- PBS, die Konjugate mit 4% HSA- PBS.
Als Konjugate dienten Peroxidase- konjugiertes RAB/IgG (heavy and light chains) der Fa. Cappel, USA, und Peroxidase- konjugiertes SAB/IgM (whole molecule) der Fa. Paesel, Frankfurt. In Vorversuchen wurden als optimale Antigen- und Konjugatkonzentrationen diejenigen ermittelt, die die größte Titerdifferenz zwischen positiven und negativen Seren ergaben; gleichzeitig wurden 5-Amino-Salicylsäure, o- Toluidin, 1,2-Phenylendiamin (PPD), o-Phenylendiamin (OPD) und Benzidin auf ihre Eignung als Substrat ausgetestet. Dabei ergaben die in Tab. 2 zusammengestellten Kombinationen die besten Ergebnisse.

Antigen	Konjugat	Substrat
Extrakt (10 µg/ml c.b.)	RAB/IgG (1:1000)	5-Amino-salisylsre
Extrakt (10 µg/ml c.b.)	RAB/IgM (1:100)	5-Amino-salicylsre
Extrakt (10 µg/ml c.b.)	RAB/IgM (1:1000)	o-Toluidin
Trypsinierungsprodukt (15 µg/ml c.b.)	RAB/IgM (1:250)	o-Toluidin

Tab. 2: Zusammenstellung der im ELISA geeignetsten Antigen - Konjugat - Substrat - Kombinationen

Wegen ihrer größeren Empfindlichkeit wurden nachfolgend o- Toluidin für alle IgM- Titerbestimmungen und 5-Amino-salicylsäure im IgG- ELISA verwendet.

5-Amino-salicylsäure wurde durch Auflösen von 400 mg 5-Amino-2-hydroxy-benzoesäure $C_7H_7NO_3$ (5-Amino-salicylsäure) in 500 ml Aqua dest. unter Rühren bei 70°C hergestellt und mit 1 N NaOH auf pH 6 eingestellt. Diese Lösung mischte ich zum Gebrauch mit 0,05%-iger H_2O_2 im Verhältnis 10 : 1.

O- Toluidin erhielt ich durch Lösen von 21,2 mg 3,3'-Dimethyl - benzidin (o-Toluidin) in 1 ml N,N- Dimethylformamid und Auffüllen mit Natriumazetatpuffer, pH 3,7, ad 100 ml. Die Mischung dieser Lösung mit 30%-iger H_2O_2 erfolgte im Verhältnis 100 : 1.

Die Durchführung des Tests umfaßte wiederum verschiedene Arbeitsgänge:

- Coating, also das Einpipettieren von je 100 µl geeigneter Antigenverdünnung in die Vertiefungen der Polystyrolplatten und Inkubation über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer,
- Waschen der Microplates: Ausgießen der Antigenverdünnung, 2 x 2 min Spülen mit Leitungswasser und Ausklopfen der Flüssigkeitsreste, Füllen mit PBS-Tween, 2 min Stehenlassen, Trockenklopfen
- Herstellen der Serumverdünnungen: In die erste Lochreihe der Platte wurden pro Loch 150 µl, in die übrigen 50 µl 0,5% HSA-PBS vorgegeben; mit Ausnahme des ersten Lochs (Konjugat- Substrat-Kontrolle) wurden in der ersten Reihe 10 µl Serumprobe je Loch hinzugefügt; dies ergab eine Verdünnung von 1 : 16; durch Über-

pipettieren von jeweils 50 µl Serumverdünnung wurden die Verdünnungsstufen 1:32, 1:64,..., 1:1024, 1:2048 hergestellt,
- Inkubation auf einem Taumelgerät 1 Stunde bei 37°C,
- Ausgießen der Serumverdünnungen und Waschen der Microplates,
- Einfüllen der Konjugatverdünnung (50 µl je Loch),
- Inkubation auf einem Taumelgerät 1 Stunde bei 37°C,
- Ausgießen und Waschen der Microplates,
- Einfüllen der gebrauchsfertigen Substratlösung (100 µl je Loch),
- Inkubation bei Zimmertemperatur im Dunkeln: mit 5-Amino-salicylsäure 1 Stunde, mit o- Toluidin 30 min.

Anschließend wurden die Absorptionswerte im Titertek- Multiscan-Photometer bei Verwendung von o- Toluidin sofort bei 620 nm, bei Salicylsäuregebrauch nach Abstoppen der Reaktion mit 1 N NaOH (50 µl/Loch) bei 450 nm abgelesen und automatisch ausgedruckt. Als Blank- Wert diente die Konjugat- Substrat- Kontrolle. Die Ergebnisse wurden als Endpunkttiter angegeben, d.h. der Titer entsprach derjenigen Serumverdünnung , die einen Extinkti - onswert ergab über dem einer Gruppe bekannt negativer Serumproben. Zur Kontrolle wurden zunächst Seren von 10 blutparasiten - freien Rindern untersucht und dann Seren von 10 Rindern, die mit Babesien oder Sarkosporidien infiziert waren. Als "critical range" wurde eine Absorption von 0,15 festgelegt. Bei einer Serumverdünnung von 1:32 lagen alle trypanosomennegativen Tiere unter diesem Grenzwert.

Als Immunpräzipitation verwendete ich eine Technik, die einer nach OUCHTERLONY (1962) modifizierten Agargeldoppeldiffusion entsprach. 1,5%-ige Agarose-H (LKB, Schweden) wurde bei 70°C in Tris-Barbiturat- Puffer, pH 8,6 (LKB) gelöst und auf die hydrophile Seite von Multiphor- Plastic- Plates (LKB) zu einer Schichtdicke von 2,5 mm ausgegossen. Nach mindestens dreistündigem Erstarren der Agarose bei 4°C in der feuchten Kammer wurden Löcher von 3 mm Durchmesser in die Gele gestanzt und mit einem dünnen Film heißer 1%-iger Agarose gegen die Unterlage abgedichtet. Von Antigen und Seren wurden zunächst 10 µl/Loch eingefüllt. Nachdem diese Menge in die Agarose diffundiert war, wurden nochmals 10 µl je Loch nachgegeben. Dann wurden die Gele in der feuchten Kammer bei 4°C

solange inkubiert (3-5 Tage), bis scharfe Präzipitationslinien sichtbar waren. Sie wurden 48 Stunden in 0,9%-iger NaCl und 24 h in Aqua dest. gewaschen, vorgetrocknet durch gleichmäßiges Herauspressen von Flüssigkeit in Filterpapier und Zellstoff und vollends getrocknet im warmen Luftstrom.
Die Proteinfraktionen wurden mit Coomassie Brilliant Blue R 250 der Firma Merck (0,5 g Coomassie Blue, 45 ml Äthanol 96%, 10 ml Eisessig, 45 ml Aqua dest.) gefärbt. Nach einer Färbedauer von 60 min wurde überschüssiger Farbstoff mit der Entfärbelösung (45 ml Äthanol, 10 ml Eisessig, 45 ml Aqua dest.) ausgewaschen.

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Serumproteine wurde das "Elphor"- System (Mikro- Rapid- Grundausrüstung für Kurzzeitelektrophorese, Fa. Bender und Hobein) benutzt. Als Trägermaterial dienten Zelluloseazetatfolien (Typ 12200).

Puffer:	Diäthylbarbiturat	14,37	g
	Zitronensäure	1,1	g
	Aqua dest.	ad 1,2	l
Färbebad:	Amidoschwarz	5,0	g
	Methanol	900	ml
	Eisessig	100	ml
Entfärbebad:	Methanol	900	ml
	Eisessig	100	ml
Tranzparenzbad:	Methanol	400	ml
	Äthanol	400	ml
	Eisessig	200	ml

Die Laufzeit betrug 25 min bei 230 V Gleichspannung (Netzgerät "Elphor Vario 1"). Die automatische Auswertung erfolgte durch "Elphorgraph".

Der Gesamteiweißgehalt der Serumproben wurde mit der Biuret- Methode bestimmt. Biuret- Reagenz und Eiweißstandard (6 g/ml) stammten von der Fa. Boehringer, Mannheim. Die Extinktionen wurden bei einer Wellenlänge von 546 nm im Absaug- Spektralphotometer (PCP 6121 der Fa. Eppendorf) gemessen.

Schließlich wurden IgG, IgG_1 und IgM quantitativ mit der Radioimmundiffusionstechnik (RID) nach MANCINI und Mitarb.(1965) bestimmt. Hierzu wurden Testkits der Fa. Miles vorschriftsmäßig verwendet.

Zum Schluß werden die bei den verschiedenen Methoden verwendeten, unterschiedlichen Pufferlösungen in ihrer Zusammensetzung dargestellt:

PBS (phosphate- buffered saline), pH 7,2-7,6

$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$		17,8 g
KH_2PO_4		1,36 g
NaCl		87,7 g
Aqua dest.	ad	10,0 l

PBS - Tween, pH 7,2-7,6

NaCl		80,0 g
KH_2PO_4		2,0 g
$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$		14,4 g
KCl		2,0 g
Tween 20		5,0 ml
Aqua dest.	ad	10,0 l

PSG, pH 8

$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$		10,14 g
$NaH_2PO_4 \times H_2O$		0,41 g
NaCl		2,55 g
Glukose $\times H_2O$		11,0 g
Aqua dest.	ad	1,0 l

Coating - buffer , pH 9,6

Na_2CO_3		1,59 g
$NaHCO_3$		2,93 g
Aqua dest.	ad	1,0 l

Natriumazetatpuffer, pH 3,7

$CH_3COONa \times 3\ H_2O$		13,6 g
Eisessig		5,7 ml
Aqua dest.	ad	1,0 l

Tris - Barbiturat - Puffer, pH 8,6

Tris		8,86 g
Diäthylbarbitursäure		4,48 g
Na- Azid		0,13 g
Ca- Lactat		0,11 g
Aqua dest.	ad	1,0 l.

B. Ergebnisse

1. Charakterisierung der Antigenpräparationen über SDS - Elektrophoresen

Folgende Proben wurden - denaturiert in SDS- Probenpuffer- über SDS- Polyakrylamidgele aufgetrennt:

- Trypanosoma congolense, beschallt,
- 2500 x g - Überstände ("Trypsinierungsprodukt") und Rückstände von T.congolense, die 10 und 20 Minuten schonend trypsiniert wurden,
- 48000 x g - Überstände von T.congolense, die mit ("Extraktantigen") oder ohne Zusatz von n-Octyl-glucopyranosid beschallt wurden.

Zur Molekulargewichtsbestimmung der Proteine liefen bei jeder Elektrophorese parallel zu den Proben Eiweißstandards mit.
Ganze T.congolense enthielten eine Vielzahl von Proteinen; ihre Banden ordneten sich auf den SDS- Gelen im gesamten Molekulargewichtsbereich von ca. 10000 - 90000 Daltons an (Abb.1). In zehnminütiger Trypsinbehandlung wurde von den Trypanosomen ein Molekül mit einheitlichem Molekulargewicht von etwa 54000 D abgespalten, das sich nach 2500 x g - Zentrifugation im löslichen Überstand befand (Abb.1).Der aus angedauten Trypanosomen bestehende Rückstand zeigte- vor allem nach Extraktion - eine Abnahme des 54000 D- Proteins. Das Trypsinierungsprodukt von 54000 D ist identisch mit dem langen, N- terminalen Ende der T.congolense- VSA's (RAUTENBERG , REINWALD, RISSE,1980). Bei 20-minütiger Trypsinierung kam es zu einem zunehmenden Abbau der VSA- Moleküle, so daß kleinere Spaltprodukte mit Molekulargewichten von 20000-40000 D entstanden.
Die in allen Trypsinierungsüberständen deutlichen Banden bei etwa 24000 und 27000 D dürften Trypsin und Trypsininhibitor entsprechen.
Die löslichen Bestandteile eines Trypanosomenhomogenats (Extrakt-Antigen) setzten sich aus vielen Proteinen zusammen. Bei Zusatz von n-Octyl-glucopyranosid während der Beschallung der T.congolense ging ein Protein mit dem MG von 54000 D verstärkt in Lösung (Abb.1); das mit dem Trypsinierungsprodukt übereinstimmende MG läßt im Extraktantigen einen großen Anteil abgespaltener Oberflächenantigene vermuten.

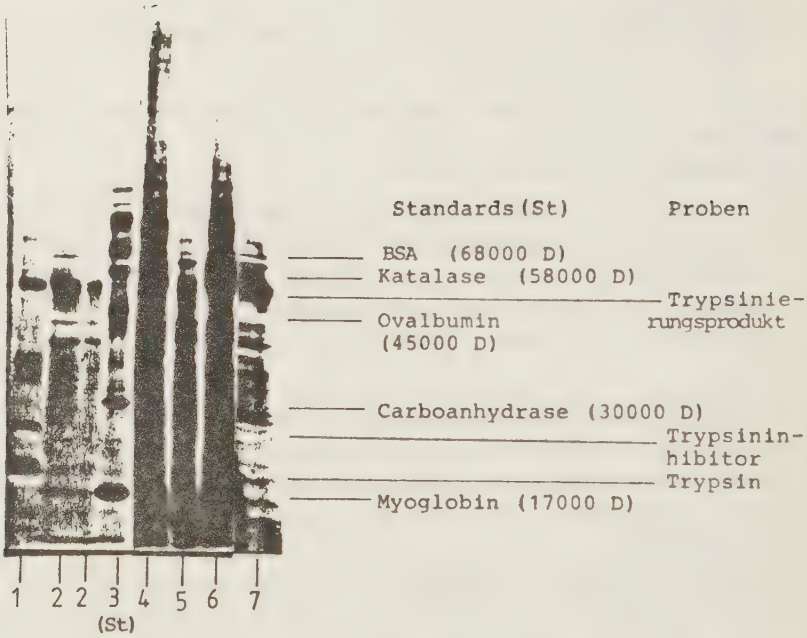

Abb. 1: Proteinbanden von Trypanosoma congolense- Antigen-Präparationen nach SDS- elektrophoretischer Auftrennung

1 = 2500 x g - Überstand nach Trypsinierung (Trypsinierungsprodukt")

2 = 48000 x g - Überstand von T.congolense, die unter Zusatz von n-Octyl-glucopyranosid beschallt wurden ("Extraktantigen")

3 = Standards

4 = 2500 x g - Rückstand nach Trypsinierung

5 = 48000 x g - Überstand vom trypsinierten Rückstand nach Beschallung

6 = T. congolense, beschallt

7 = 48000 x g - Überstand von T.congolense, die unter Zusatz von n-Octyl-glucopyranosid beschallt wurden, nach Lyophilisation und erneutem Auflösen ("Extraktantigen")

2. Serologische Untersuchungen

a) IFAT

Unter Verwendung fixierter Trypanosomen als Antigen wurden die IgM- und IgG- Titer der Rinder bestimmt. Da auch bei den Kontrolltieren eine Fluoreszenz bis zur Serumverdünnung von 1:16 auftrat, wurden erst Titer ab 1:32 als T.congolense- spezifisch bewertet.
Mit dem Konjugat RAB/IgG ergaben sich bei den reinfizierten Tieren die in Abb.2 und bei den erstmals beimpften die in Abb.3 dargestellten Titerverläufe.

Bei allen Rindern hatten die zeitlichen Veränderungen der IgG - Konzentrationen eine ähnliche Grundform, wenn auch in unterschiedlich starker Ausprägung. Nach steilen, postinfektiösen Titeranstiegen blieben die Antikörperkonzentrationen entweder bis zum Ende des Untersuchungszeitraums unregelmäßig erhöht oder fielen langsam wieder ab. Zum Infektionszeitpunkt hatten nur die reinfizierten Tiere S1 und S2 Resttiter von 1:32 und 1:64. Im späteren Infektionsverlauf wurden Maximaltiter von 1:1024 (D3), 1:512 (S1, S2, D1, D2) und 1:128-1:256 (S3, F1, F2, K1, K2) erreicht.
Bei den reinfizierten Dahomey- Rindern produzierten D1 und D2 erste spezifische Antikörper bereits in der ersten Woche p.i.. Die IgG- Konzentrationen nahmen bei ihnen um 5 Titerstufen zu, blieben meist maximal erhöht und fielen innerhalb von 50 Tagen nach Berenilbehandlung um 2 Stufen wieder ab (Tab.3)
Die reinfizierten Schwarzbunten zeigten eine Zunahme der IgG am 14. (S1) und 18. (S2) Tag p.i.; die Titer stiegen um 3 (S2) bis 4 (S1) Stufen. Maxima von 1:512 wurden von S1 zwischen dem 39. und 45. Tag und nochmals dem 70. und 80. Tag p.i., von S2 am 18. und 42. Tag p.i. erreicht. Berenilverabreichung bewirkte Sinken der IgG- Titer um 1 Stufe in 50 Tagen (Tab.3).
Von den erstinfizierten Versuchstieren reagierte D3 am stärksten. Maximaltiter von 7 Stufen über den präinfektiösen Werten (1:1024) waren am 21. und 28. Tag p.i. meßbar, nachdem die Titer erst ab dem 12. Tag p.i. anstiegen. Die Berenilapplikation ließ - wie bei D1 und D2 - die IgG innerhalb von 50 Tagen um 2 Titerstufen zurückgehen (Tab.3).

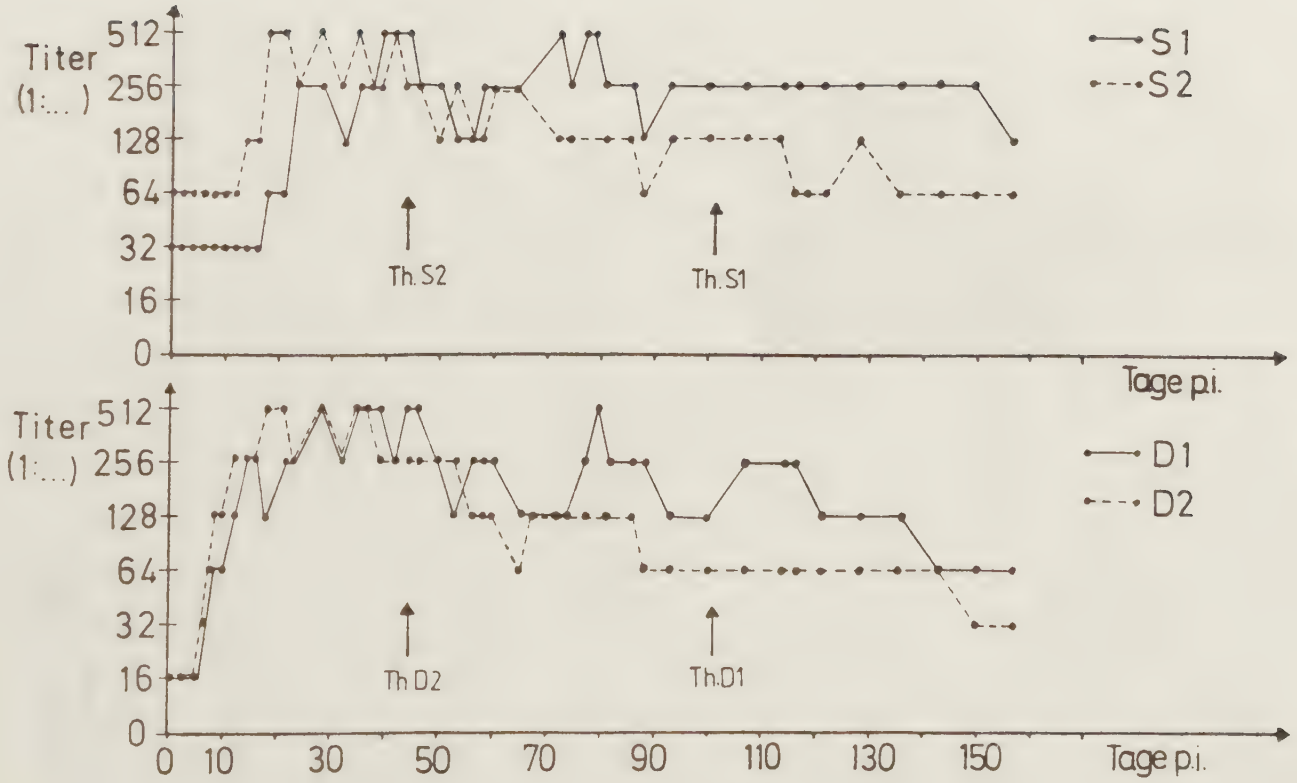

Abb. 2 : IgG - Titerverläufe der mit T.congolense reinfizierten Schwarzbunten (S1,S2) und Dahomeys (D1, D2), gemessen im IFAT (Th.= Berenilapplikation)

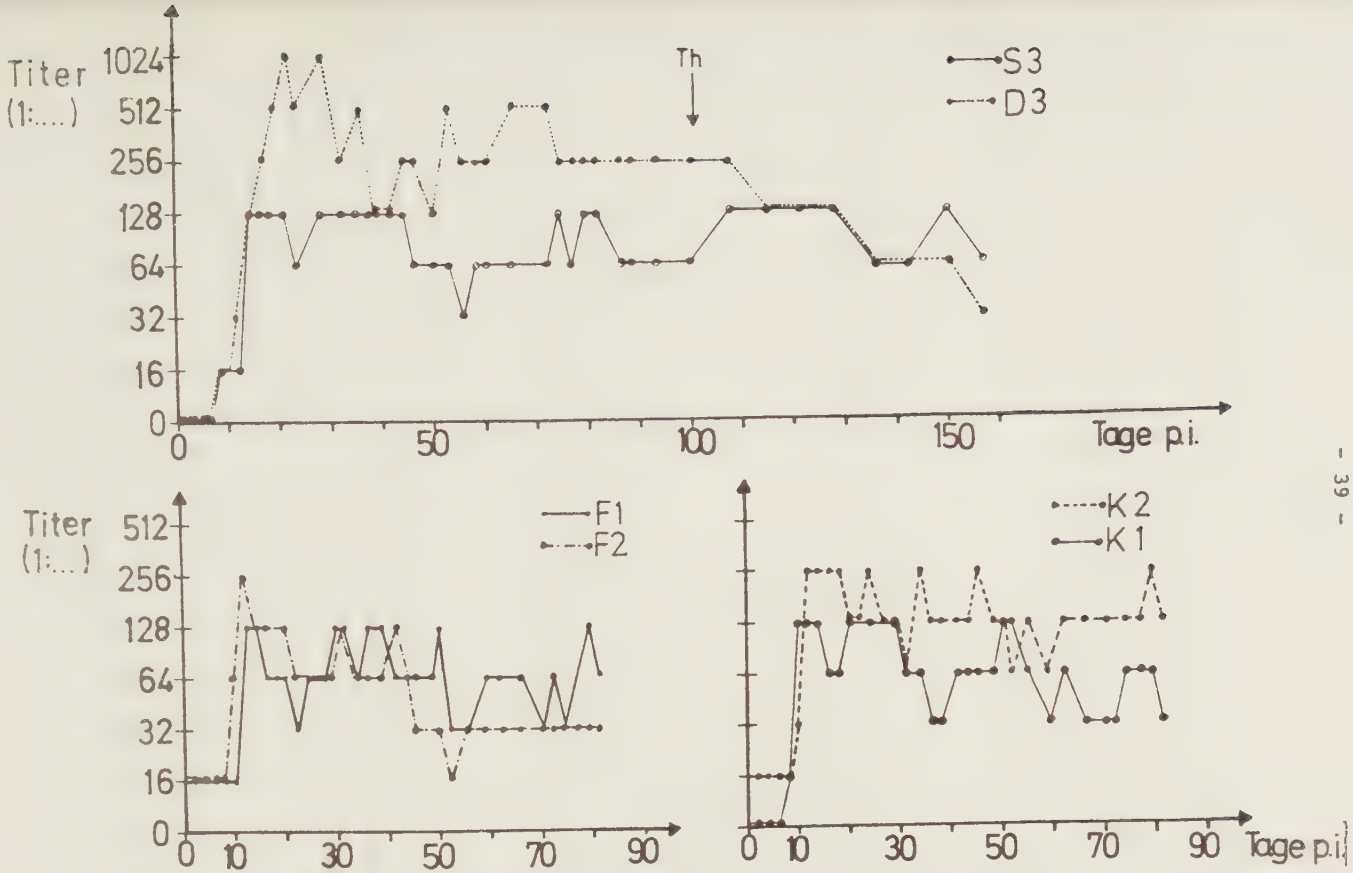

Abb.3: IgG- Titerverläufe mit T.congolense erstinfizierter Rinder (S = Schwarzbuntes, D = Dahomey, F = Fleckvieh, K = N'dama- Fleckvieh- Kreuzung), gemessen im IFAT (Th. = Berenilapplikation)

Die übrigen erstinfizierten Rinder antworteten auf die T.congolense- Infektion etwas schwächer. Die IgG- Anstiege erfolgten über 3 (F1) bis 4 (S3, F2, K1, K2) Stufen. Die Titer schwankten überwiegend zwischen 1:64 und 1:128, lediglich bei K2 zwischen 1:128 und 1:256 (Tab.3). Nach etwa 50 Tagen p.i. nahmen die Antikörperkonzentrationen nur bei F2 und K1 sogar ohne spezifische Behandlung um 2-3 Titerstufen ab; bei S3 blieben sie trotz Therapie dagegen gleichmäßig erhöht.

Versuchsrind	S1	S2	S3	D1	D2	D3	F1	F2	K1	K2
Ausgangstiter (1:...)	32	64	0	16	16	0	16	16	0	16
1. Titeranstieg (Tage p.i.)	14	18	14	7	7	12	12	10	10	12
absolute Maximaltiter (1:..)	512	512	128	512	512	1024	128	256	128	256
Anzahl der Titerstufen	4	3	4	5	5	7	3	4	3	4
Titerabfall 50 Tage nach Berenilbehandlung (Stufen)	1	1	-	2	2	2				

Tab.3: Zusammenfassende Darstellung der IgG- Titerverläufe (IFAT) bei experimentell mit T.congolense infizierten Rindern verschiedener Rassen

Es wurden ferner die IgM- Titerverläufe verfolgt. Die mit dem K[illegible]jugat RAB/IgM (Fc)-FITC gewonnenen Ergebnisse sind für die reinfizierten Tiere in Abb.4, für die anderen in Abb.5 dargestellt. Alle Rinder (mit Ausnahme von S1 und S2) zeigten eine charakteristische IgM- Antwort mit kurzfristigem, initialen Anstieg der Antikörper und anschließendem, langsamen Abfall zurück zu präinfektiösen Ausgangswerten. Hierbei nahmen die Titer bei D3 um 7 Stufen auf 1:[illegible], bei S3, D1, D2, F1, F2, K1 und K2 um 4 Stufen auf 1:256 zu. Die reinfizierten Schwarzbunten S1 und S2 hatten dagegen in den 157 Tagen p.i. anhaltende, geringe Titerschwankungen zwischen 1:16 und 1:[illegible] einen meßbaren Resttiter von 1:32 hatte nur S2 (Tab.4).

Versuchsrind	S1	S2	S3	D1	D2	D3	F1	F2	K1	K2
Ausgangstiter (1:...)	16	32	-16	-16	-16	0	0	16	0	0
1. Titeranstieg (Tage p.i.)	10	14	7	7	7	12	10	10	10	10
absolute Maximaltiter (1:..)	64	64	256	256	256	1024	256	256	256	256
Anzahl der Titerstufen	1-2	1-2	4	4	4	7	4	4	4	4
Titerabfall 50 Tage nach Berenilbehandlung (Stufen)	-	-	-	-	-	-				

Tab.4: Zusammenfassende Darstellung der IgM - Titerverläufe (IFAT) bei experimentell mit T.congolense infizierten Rindern verschiedener Rassen

Weiterhin wurden mit Antigen aus "gepoolten" T.congolense IgG - Titer bei den Schwarzbunten und den Dahomeys bestimmt.
Als positiv galt jede Oberflächenfluoreszenz von mehr als 10 Trypanosomen pro Blickfeld bei 40-facher Vergrößerung. Dabei traten kaum Abweichungen der Antikörperkonzentrationen von den Ergebnissen mit ungepoolten Trypanosomen auf (Tab.5).
Es entstand lediglich mit den Seren der schwarzbunten Rinder auf den IFAT - Objektträgern das Bild gleichmäßig schwacher Fluoreszenz oberflächlicher und innerer Zellstrukturen fast aller Trypanosomen; mit den Dahomey- Seren fluoreszierten dagegen weniger Parasiten stärker und rein oberflächlich. Dieser Effekt war bei D3 am stärksten ausgeprägt.

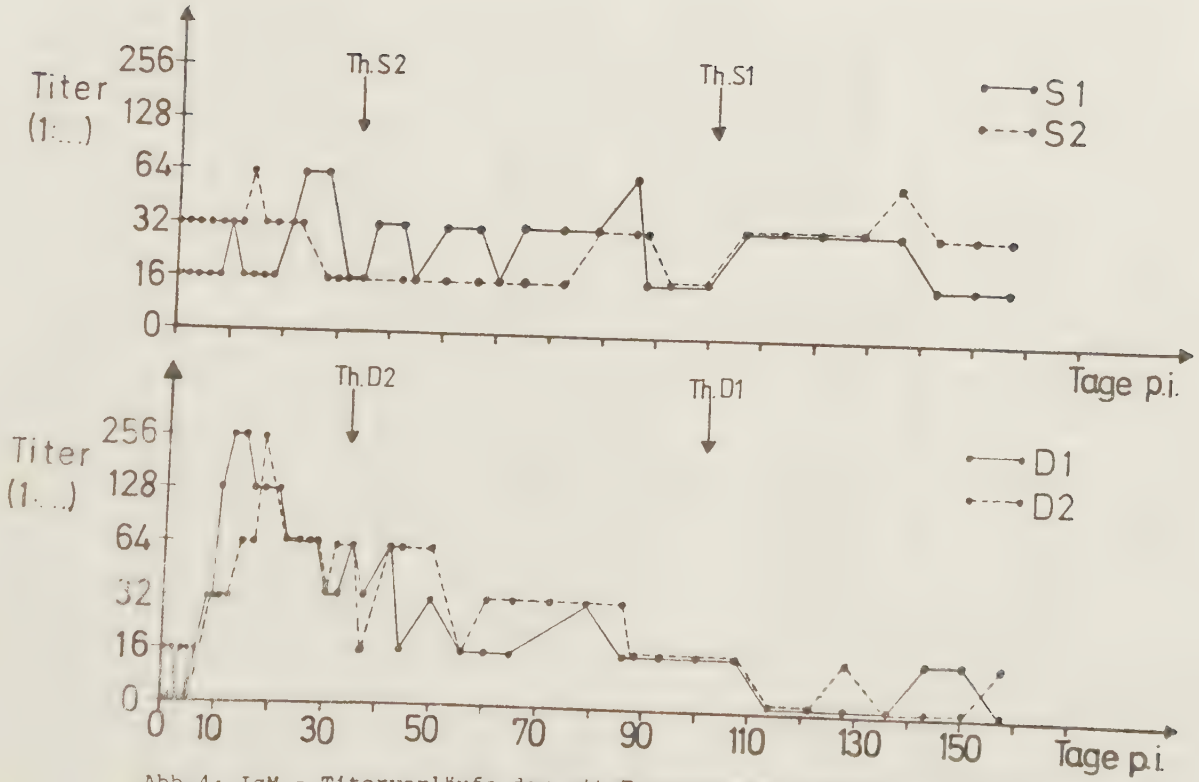

Abb.4: IgM - Titerverläufe der mit T.congolense reinfizierten Schwarzbunten (S1, S2) und Dahomeys (D1,D2), gemessen im IFAT (Th. = Berenilapplikation)

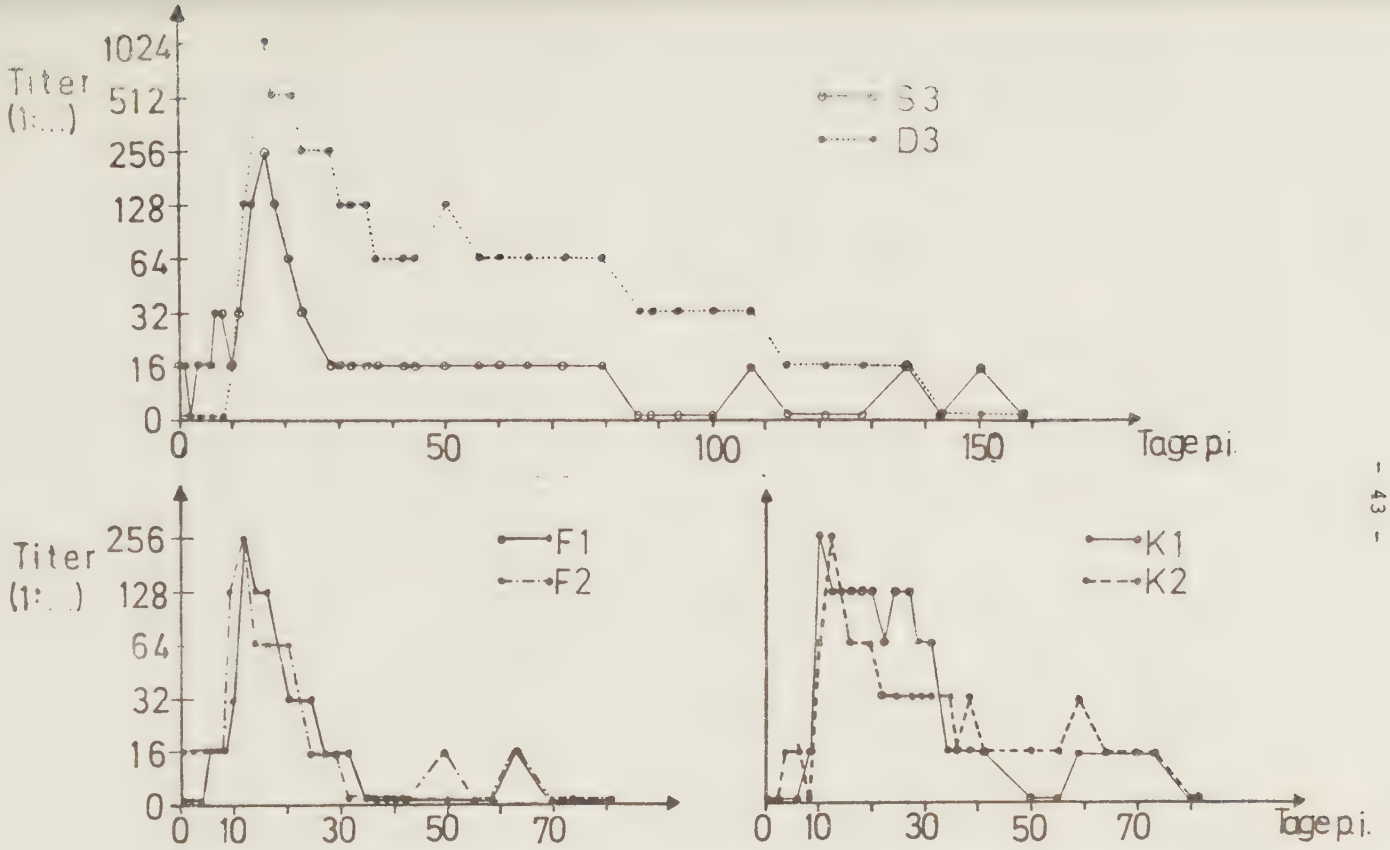

Abb.5: IgM- Titerverläufe der mit T.congolense erstinfizierten Rinder (S = Schwarzbuntes, D = Dahomey, F = Fleckvieh, K = N'dama- Fleckvieh-Kreuzung), gemessen im IFAT (Th. = Berenilapplikation)

Tage p.i.	S1	S2	S3	D1	D2	D3
-3	32	64	16	16	16	0
0	32	64	0	16	16	0
3	32	64	0	16	16	16
9	32	64	0	64	32	16
14	32	128	64	256	256	128
25	256	512	256	512	512	512
32	256	128	64	512	512	512
42	512	512	128	256	512	128
50	256	256	64	256	256	256
60	256	128	64	256	128	512
79	256	256	128	512	128	512
95	512	128	64	256	64	256
107	256	128	128	256	64	256
128	256	128	128	64	64	64
150	128	64	128	32	64	32

Tab.5: IgG - Titerverläufe der mit T.congolense infizierten Schwarzbunten und Dahomeys, gemessen im IFAT mit "gepoolten" Trypanosomen

Schließlich wurden nur stichprobenartig Seren vom 14., 16. und 18. Tag p.i. untersucht mit Trypanosomen, deren Oberflächenantigene vor Glutaraldehydfixation durch 10-minütige Trypsinbehandlung abgespalten worden waren.Mit RAB/IgG - Konjugat führte dieses Antigen bei den Schwarzbunten zu einem Titerabfall um 1-2 Stufen, bei den Dahomeys um 1-3 Stufen. Die IgM - Titer verringerten sich nur bei den Dahomeys nach Abspaltung der VSA's um 1-2 Stufen.

b) ELISA

Die Tests wurden in Vorversuchen so eingestellt, daß 10 als negativ bekannte Testrinderseren mit keinem der verwendeten Antigene oder Konjugate höhere Extinktionswerte als 0,15 ("range") ergaben. Gemessen hieran lagen die Kontrolltiere S4, D4, F3 und K3 im Titerbereich 1: 0-16, d.h. die mit ihren Seren erreichten Extinktionen überschritten den "range" im Höchstfall bei einer Serumverdünnung von 1:16. Mit Extrakt- Antigen wurden IgM- und IgG- Titer bestimmt, mit dem Trypsinierungsprodukt gelang nur die Messung der IgM- Antikörper.

Unter Verwendung des Extrakt- Antigens traten die ersten IgG- Titer in der 2.-3. Woche für S1, S2 und D3 sowie in der 2. Woche für die übrigen Rinder auf (Abb. 6 und 7). Einen deutlichen Resttiter von 1:64 hatte S2; bei S1 und D1 waren die Ausgangstiter mit 1:16-1:32 leicht erhöht (Tab.6). Von den Ausgangswerten stiegen die Antikörperkonzentrationen um 6 Titerstufen bei S1 und D2, nach Behandlung auch bei D1, um 5 Stufen bei S2, D3 und F1, nach Behandlung auch bei S3 und um 4 Stufen bei F2, K1 und K2 (Tab. 6).

Versuchsrind	S1	S2	S3	D1	D2	D3	F1	F2	K1	K2
Ausgangstiter (1:...)	-32	64	16	-32	-16	-16	16	16	16	16
1. Titeranstieg (Tage p.i.)	14	18	12	10	10	14	12	10	10	12
absolute Maximaltiter (1:..)	2048	2048	512	2048	1024	512	512	128	128	256
Anzahl der Titerstufen	6	5	5	6	6	5	5	4	4	4
Titerabfall 50 Tage nach Berenilbehandlung (Stufen)	2	1	1	3	3	3				

Tab.6: Zusammenfassende Darstellung der IgG- Titerverläufe (ELISA mit Extraktantigen) bei experimentell mit T. congolense infizierten Rindern verschiedener Rassen

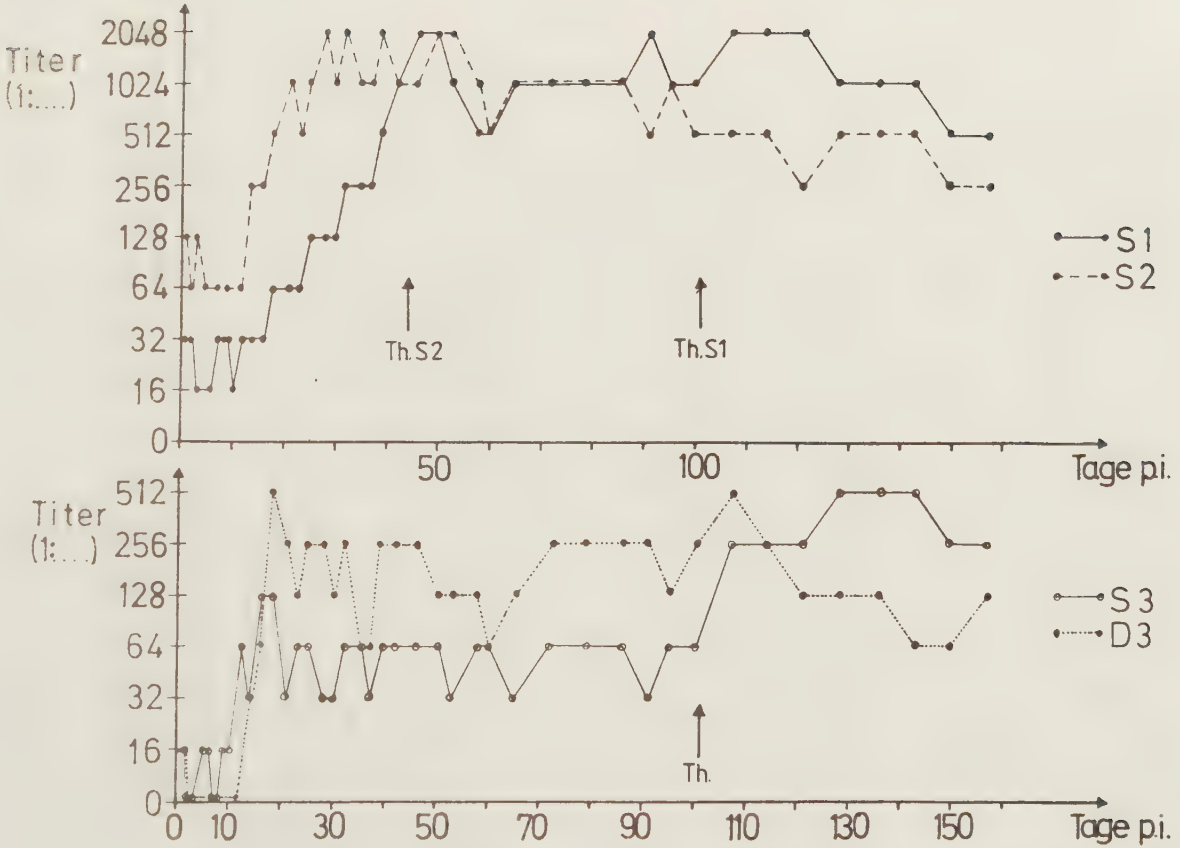

Abb.6: IgG- Titerverläufe der mit T.congolense reinfizierten Schwarzbunten (S1,S2) und der erstinfizierten Rinder S3 (Schwarzbuntes) und D3 (Dahomey) , gemessen im ELISA mit Extraktantigen (Th. = Berenilapplikation)

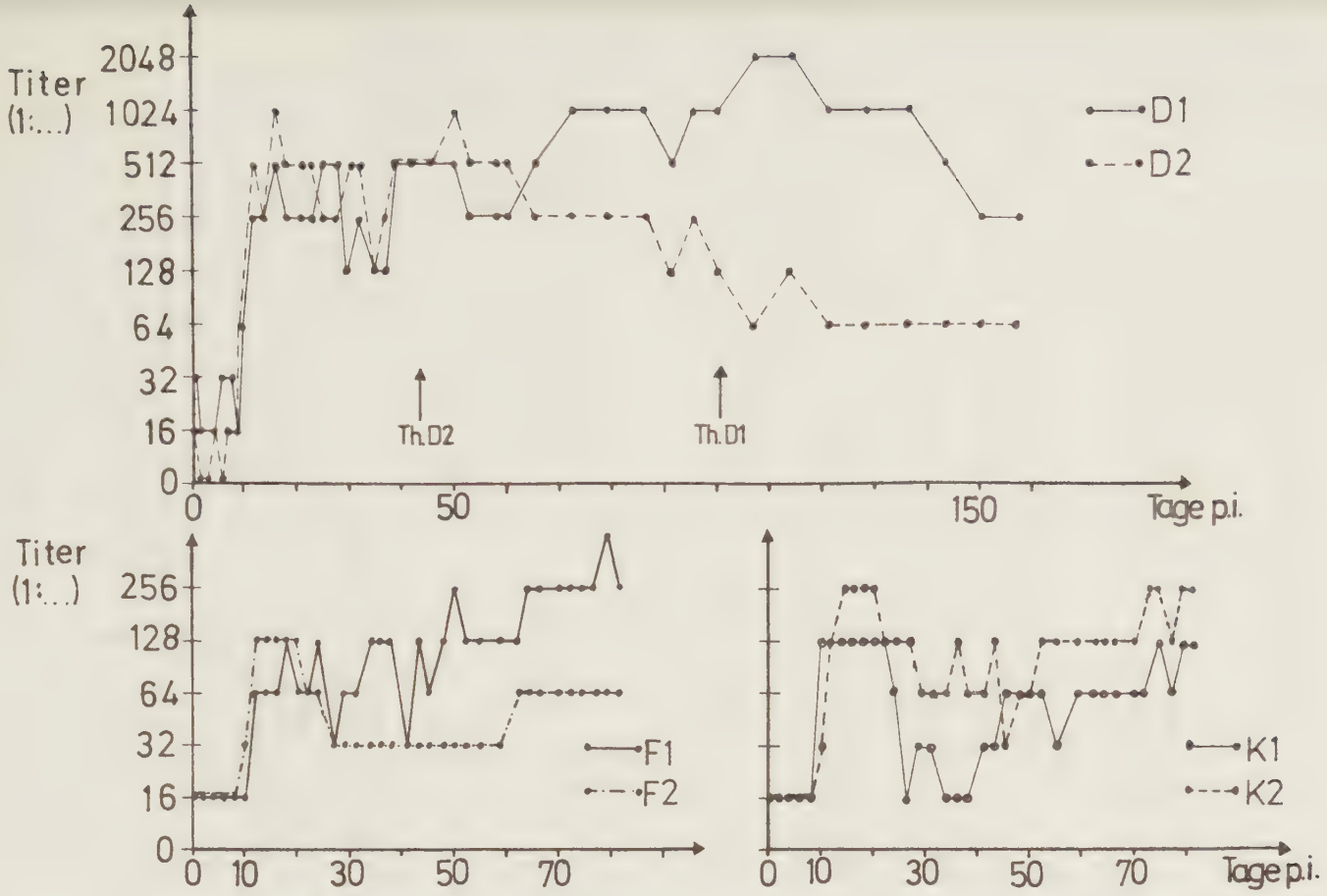

Abb.7: IgG- Titerverläufe der mit T.congolense reinfizierten Dahomeys (D1, D2) und der erstinfizierten Fleckvieh (F1, F2)- und N'dama- Fleckvieh- Kreuzungsrinder (K1, K2), gemessen im ELISA mit Extraktantigen (Th. = Berenilapplikation)

Als absolut höchste Titer wurden 1:2048 von S1, S2 und D1, 1:1024 von D2 und 1:512 von S3, D3 und F1 erreicht. Im Gegensatz zum IFAT blieben die Antikörperkonzentrationen der Rinder länger maximal erhöht; auch wurden die individuellen Höchsttiter meist sehr spät im Infektionsverlauf, bei S3 und D1 sogar erst nach der Berenilbehandlung erreicht. Auf die Therapie folgten in allen Fällen kurzfristige Titeranstiege. Dann fielen die Titer um mehrere Stufen ab. Auffallenderweise lagen die IgG- Titer bei den Dahomeys 50 Tage nach Berenilgabe bereits 3 Stufen unter ihren Maxima (Tab.6).

Erste spezifische IgM- Produktion war schon in der 1. Woche p.i. bei S1, S2 und D1 (3.Tag p.i.) sowie bei D2 und D3 (6. Tag p.i.), in der 2. Woche p.i. bei K1 (8. Tag p.i.), F1, F2, K2 (10.Tag p.i.) und S3 (14. Tag p.i.) zu messen.
Von den schwarzbunten Rindern wurden Maximaltiter erst in der 8. Woche p.i. erreicht; die Titerdifferenz von den Ausgangswerten zu den Maxima betrug bei S1 und S2 5, bei S3 6 Titerstufen (Abb.8).
Die Dahomeys hatten ihre höchsten Antikörperkonzentrationen zwischen dem 16. und 23. Tag p.i.; die Titer stiegen bei D1 und D3 um 6, bei D2, F2 und K2 um 5 Titerstufen an (Abb.9).
Die Berenilbehandlung führte bei den 3 Schwarzbunten zunächst- wie bei den IgG's- zu einem Anstieg der IgM- Antikörper; bei den Dahomeys war dieser Effekt nur undeutlich. 50 Tage nach der Behandlung waren die Titer von den Maxima bei D2 um 4, bei den übrigen Tieren (ausgenommen S3) um 2-3 Stufen abgefallen (Tab.7). D2 erreichte um den 60. Tag nach Berenilverabreichung wieder Ausgangswerte, während bei den anderen Rindern bis zum Versuchsende Titer bestanden.

Versuchsrind	S1	S2	S3	D1	D2	D3	F1	F2	K1	K2
Ausgangstiter (1:...)	64	64	16	16	32	16	16	16	16	16
1. Titeranstieg (Tage p.i.)	3	3	8	6	6	14	10	10	8	10
absolute Maxima (1:...)	2048	2048	1024	1024	1024	1024	128	512	256	512
Anzahl der Titerstufen	5	5	6	6	5	6	3	5	4	5
Titerabfall 50 Tage nach Berenilbehandlung (Stufen)	3	2	-	3	4	3				

Tab.7: Zusammenfassende Darstellung der IgM - Titerverläufe (ELISA mit Extraktantigen) bei experimentell mit T.congolense infizierten Rindern verschiedener Rassen

Bei Verwendung des löslichen Trypsinierungsproduktes als Antigen ergaben sich die in Tab.8 zusammenfassend dargestellten Ergebnisse. Es traten die ersten Titeranstiege bei S1, S2 und D3 verzögert, bei K1, K2, F1, F2, D2, D3 gleichzeitig und bei S3 früher als bei dem anderen löslichen Antigen auf. Die höchsten Titer lagen bei den Dahomey- Rindern, den Fleckviehtieren und K2 um 1, bei S1, S2 und K1 um 2 und bei S3 um 3 Titerstufen unter den mit Extraktantigen gemessenen Werten.
Erste spezifische IgM- Bildung wurde bei den Kreuzungen und beim Fleckvieh am 10. Tag p.i. wie im IFAT meßbar; dagegen trat sie bei den Schwarzbunten und den Dahomeys gegen korpuskuläres Antigen erst später auf als gegen das Trypsinierungsprodukt. Gleiche Maximaltiter wie im IFAT ergaben sich bei S3, F2 und K2, höhere IFAT- Titer wurden bei F1 und K1 (2 Stufen) und D3 (1 Stufe), niedrigere bei D1 und D2 (1 Stufe), S2 (3 Stufen) und S1 (4 Stufen) nachgewiesen. Deutlicher als im IFAT oder im ELISA mit Extraktantigen fielen die Titer der Dahomey- Rinder nach Berenilbehandlung stark ab, während die Antikörperkonzentrationen der Schwarzbunten von der Therapie im wesentlichen unbeeinflußt blieben.

Versuchsrind	S1	S2	S3	D1	D2	D3	F1	F2	K1	K2
Ausgangstiter (1:...)	64	64	16	16	16	16	16	16	16	16
1. Titeranstieg (Tage p.i.)	6	6	6	6	6	14	10	10	10	10
absolute Maxima (1:...)	1024	512	256	512	512	512	64	256	64	256
Anzahl der Titerstufen	4	3	4	5	5	5	2	4	2	4
Titerabfall 50 Tage nach Berenilbehandlung (Stufen)	1	-	-	4	4	5				

Tab.8: Zusammenfassende Darstellung der IgM- Titerverläufe (ELISA mit Trypsinierungsprodukt) bei experimentell mit T.congolense infizierten Rindern verschiedener Rassen

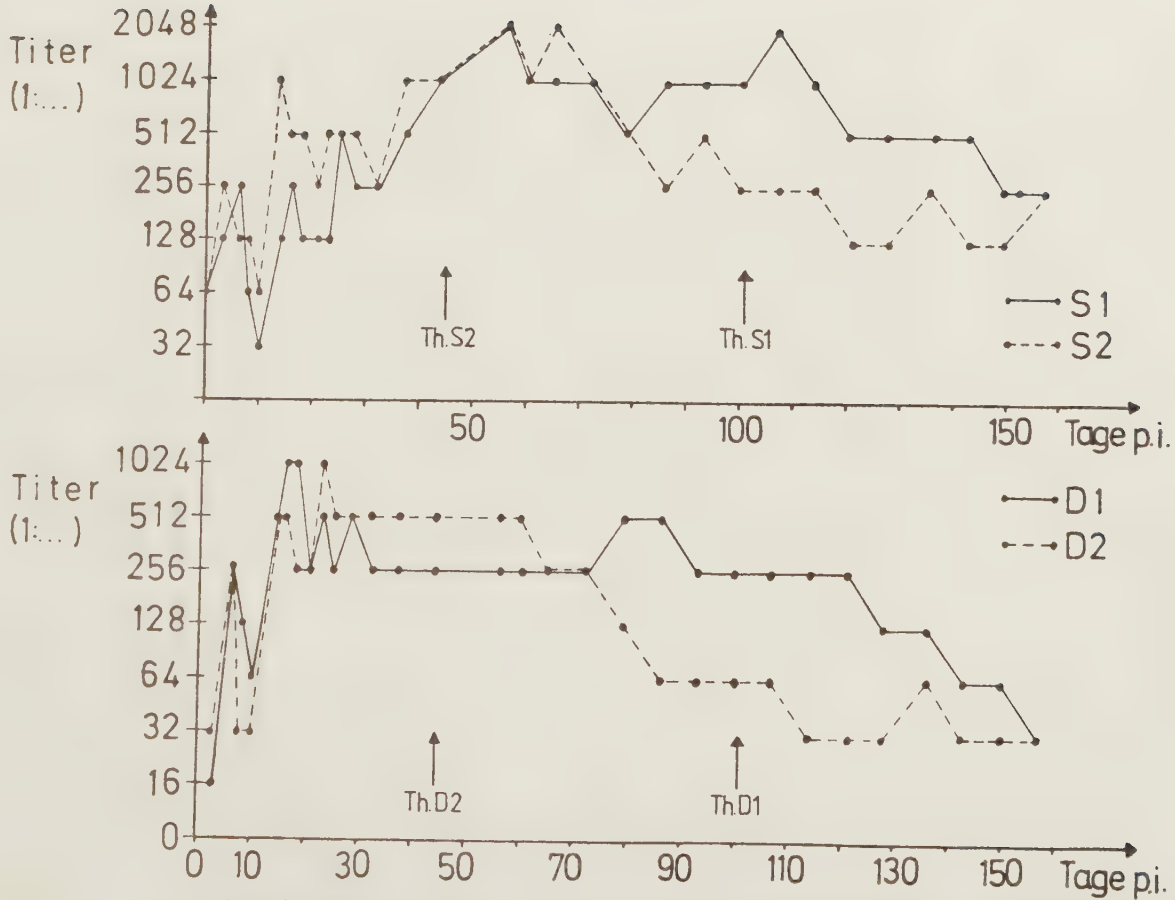

Abb. 8: IgM - Titerverläufe der mit T.congolense reinfizierten Schwarzbunten (S) und Dahomeys (D), gemessen im ELISA mit Extraktantigen (Th. = Berenilapplikation)

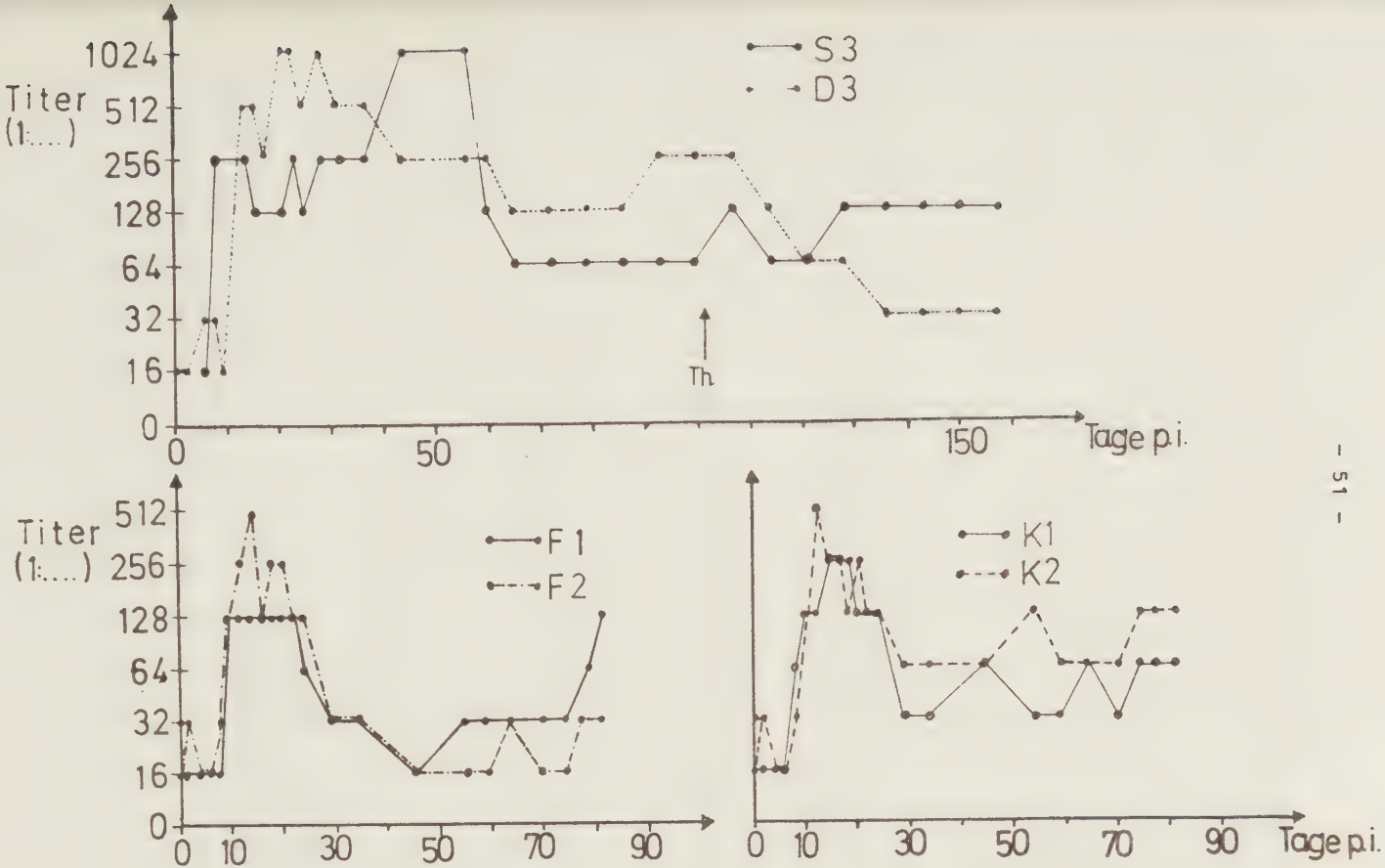

Abb. 9: IgM - Titerverläufe der mit T.congolense erstinfizierten Rinder, gemessen im ELISA mit Extraktantigen (Th. = Berenilapplikation)

Eine sichere Differenzierung infizierter von nicht infizierten Tieren war nur möglich mit der Messung von IgG- Antikörpern, da diese nach einer anfänglichen Latenzperiode über den gesamten Infektionszeitraum erhöht blieben, ferner mit den Antigenpräparationen, die die größte Vielfalt an somatischen und varianzantigenspezifischen Antigenen enthielten (Extrakt- Antigen, ganze Parasiten). Wenn auch im IFAT wie im ELISA die erstinfizierten Rinder niedrigere Titer als die reinfizierten hatten, lagen sie immer über den negativen Kontrollen. Der ELISA war mit insgesamt höheren Titern etwas empfindlicher als der IFAT.
Die IgM- Bestimmungen waren zur Selektion infizierter Rinder nicht geeignet, da sie nur das Auftreten jeweils neuer Antigene widerspiegelten (Primärantworten). Hohe IgM- Titer deuteten im IFAT auf ein frühes Infektionsstadium hin, während im ELISA mit Extraktantigen zusätzlich später gebildete Variantenpopulationen angezeigt wurden.
Der ELISA mit dem Trypsinierungsprodukt machte VSA- spezifische Titerbestimmungen über Enzymreaktionen möglich. Ein Behandlungserfolg ließ sich mit keinem serologischen Test im Untersuchungszeitraum eindeutig bestätigen.

Mit den Testkits von Miles (RID = radiale Immundiffusion) lagen die Immunglobulinkonzentrationen der Seren meist außerhalb des vorgegebenen Meßbereichs. Da bei diesen hohen oder niedrigen Werten keine lineare Beziehung zwischen Ringdiameter und Immunglobulinkonzentration vorlag und auch eine Verdünnung der Seren keine auswertbaren Ergebnisse zuließ, blieben die quantitativen Immunglobulinbestimmungen unberücksichtigt.

c) Immunpräzipitation

Die Seren der Schwarzbunten und Dahomeys wurden in wöchentlichen Abständen über den gesamten Infektionsverlauf gegen Extraktantigen und Trypsinierungsprodukt in der Präzipitation untersucht (Abb.10). Die Seren der Kontrolltiere bildeten keine Präzipitate. Nach Diffusion der S2- Seren gegen Extrakt- Antigen wurden ab der 2. Woche p.i. an jedem weiteren untersuchten Tag 1-3 Präzipitationslinien sichtbar; bei S1 waren es ab der 6. Woche p.i. jeweils 1-2 Linien.

Für S3 ließen sich mit dem Test nur am 93. und 107. Tag p.i. präzipitierende Antikörper nachweisen (1 Linie).
Bei den Dahomey- Rindern entstand mit D1- Seren am 93. und 107.Tag p.i., bei D2 am 39. Tag p.i. und bei D3 am 16. Tag p.i. je eine Präzipitationslinie (Abb. 10).
Das Trypsinierungsprodukt wurde von D1 und den Schwarzbunten gar nicht, von D2 und D3 jeweils an den Tagen präzipitiert, an denen ihre Antikörper auch mit dem Extraktantigen unlösliche Immunkomplexe bildeten (Abb.11).

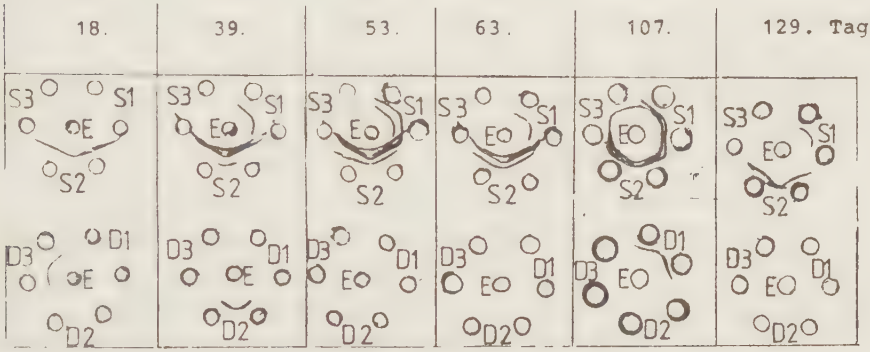

Abb.10: Immunpräzipitate der Schwarzbunten (S)- und Dahomey (D)- Seren vom 18.,39.,53.,63.,107.und 129. Tag p.i. mit Extraktantigen (E)

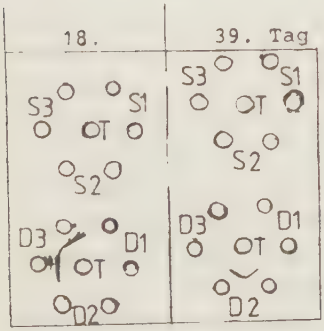

Abb. 11: Immunpräzipitate der Schwarzbunten (S)- und Dahomey (D)- Seren vom 18. und 39. Tag p.i. mit Trypsinierungsprodukt (T)

d) Gesamteiweiß- Bestimmung

Die alle 2 Tage festgestellten Gesamteiweißwerte sind in Tab.9 auszugsweise dargestellt.
Bei den Kontrolltieren waren große individuelle Unterschiede und z.T. starke Schwankungen im Untersuchungszeitraum typisch. Während S4 gleichbleibend Werte um 5,5 g/100 ml hatte, variierten sie bei D4 zwischen 5,5 und 6,8 g/100 ml. Bei K3 lag die Schwankungsbreite zwischen 6,2 und 7,4 g/100 ml; dabei traten höhere Werte vor allem zu Versuchsbeginn auf. Dieser initiale Eiweißanstieg war bei F3 noch stärker ausgeprägt (von 5,9 auf 8,3 g/100 ml).

Von den reinfizierten Rindern hatte S1 Schwankungen zwischen 5,3 und 6,9 g/100 ml; bei S2 waren um den 20. und wieder um den 110.-130. Tag p.i. Maximalwerte von 6,5 g/100 ml meßbar.
Bei den Dahomey- Rindern fielen bei D1 die Werte am 6. Tag p.i. von 7 auf 6,3 g/100 ml ab und stiegen dann am 21. Tag p.i. auf 8,6 g/100 ml; zwischen dem 35. und 85. Tag p.i. wurden Normwerte um 7 g/100 ml erreicht; schließlich folgte ein erneuter Anstieg auf 8,2 g/100 ml (128. Tag p.i.). Ähnliche Gesamteiweißzunahmen von 6,4 auf 8,2 g/100 ml zeigte D2; allerdings blieben die Werte ab dem 63. Tag p.i. konstant um 7,2 g/100 ml. Allgemein hatten die Dahomeys höhere Serumeiweißkonzentrationen als die Vertreter der anderen Rassen.

Bei den erstinfizierten Tieren hatte S3 als einziges im wesentlichen gleichbleibende Proteinwerte zwischen 5,5 und 6 g/100 ml. D3 reagierte - mit zeitlichen Verschiebungen- ähnlich wie D1.
Bei Fleckvieh- und Kreuzungsrindern war eine gleichmäßige Tendenz festzustellen; zunächst kam es zu einem Anstieg, dann zu einem Abfall auf subnormale Werte. Bei F1 und F2 lagen die Höchstwerte am 6.-10. Tag p.i. mit 8,2 und 7,6 g/100 ml 1,9 g/100 ml über den Ausgangswerten; am 62. Tag p.i. waren in 100 ml Serum nur noch 4,6-5 g Eiweiß nachzuweisen. K1 und K2 zeigten die gleichen Veränderungen in abgeschwächter Form (Tab.9).

Tage p.i.	S1	S2	S3	S4	D1	D2	D3	D4	F1	F2	F3	K1	K2	K3
0	6,3	5,5	6,0	5,3	6,9	6,3	7,5	5,9	6,3	5,7	5,9	6,3	6,6	6,6
6	6,3	5,7	5,6	5,1	6,3	6,8	6,8	5,9	7,7	7,6	8,0	7,3	7,9	7,4
10	6,3	6,4	5,5	5,1	7,8	7,2	6,5	5,9	8,2	6,6	7,3	7.1	6,5	6,8
14	6,3	6,3	5,6	5,5	8,1	6,8	6,7	6,1	6,5	5,8	7,0	6,1	6,5	6,8
21	6,0	6,0	5,5	5,7	8,6	7,5	6,4	5,5	6,6	6,7	7,1	6,3	6,2	6,5
28	6,2	5,5	5,7	5,8	7,4	7,6	7,1	6,1	5,8	5,2	6,6	5,9	5,6	6,3
35	6,3	5,7	5,7	5,4	7,1	8,2	7,1	6,6	5,5	4,9	6,1	5,6	5,4	6,4
41									5,7	5,1	6,4	5,9	5,6	6,7
49	6,9	5,9	5,7	5,6	7,0	8,2	7,7	6,5	5,2	4,8	5,9	5,6	5,3	6,4
54	6,9	6,3	5,7	5,5	7,5	8,1	7,8	6,6	5,3	4,9	6,1	5,4	5,6	6,2
63	6,5	5,9	5,8	5,7	7,1	7,1	8,1	6,3	5,0	4,6	5,9	5,4	5,8	6,2
77	6,5	5,5	5,5	5,5	6,9	7,1	7,5	5,9	6,5	5,5	6,3	6,3	6,6	6,6
84	5,3	6,0	5,9	5,4	7,2	7,1	7,6	5,7						
107	5,9	6,5	6,5	5,6	7,9	7,2	8,3	6,0						
128	6,1	6,6	6,3	5,3	8,2	7,3	6,8	6,3						
136	6,8	5,6	6,3	5,5	7,4	7,0	6,9	6,1						

Tab.9: Gesamteiweißkonzentrationen (g/100 ml) der Schwarzbunten (S1-S4), Dahomeys (D1-D4), Fleckvieh (F1-F3)- und N'dama-Fleckvieh- Kreuzungsrinder (K1-K3) im Untersuchungszeitraum

e) Serumeiweißfraktionen

Die elektrophoretische Auftrennung der Serumproteine erfolgte für alle Rinder 8-10 x innerhalb der ersten 75 Tage nach der Infektion. Allgemein waren starke Schwankungen der prozentualen und absoluten Werte beim Vergleich der verschiedenen Tiere wie auch bei jedem einzelnen Tier über den Beobachtungszeitraum festzustellen. Dies zeigte sich in der Auflistung der minimalen und maximalen Prozentwerte der Kontrolltiere besonders deutlich (Tab.10).

Kontrolltier	Albumine	α-Globuline	β-Globuline	γ-Globuline
S4	56,1-59,6	11,8-16,0	9,3-13,0	16,2-20,7
D4	43,5-45,8	13,6-17,4	11,8-13,3	25,8-29,3
F3	44,0-51,5	12,2-14,5	8,4-10,5	26,0-32,7
K3	45,8-50,6	10,5-13,7	10,0-11,6	26,3-30,1

Tab.10: Prozentuale Verteilung der Serumeiweißfraktionen (Minima - Maxima) bei den nicht infizierten Kontrollrindern der verschiedenen Rassen

Bei den infizierten Rindern kam es in unterschiedlichem Ausmaß zwischen Infektionstag und 50. Tag p.i. zu einer relativen Abnahme der Albumine und einer Zunahme der γ-Globuline. Die stärksten Veränderungen zeigte S1 mit einem Absinken der Albumine von 51,7% auf 38,4% und einem Anstieg der γ-Globuline von 27% auf 37%; ähnliches trat auch bei D2 auf (Albumine 54,3% →35,9%, γ-Globuline 25,2% → 40,4%). Anschließend näherten sich die Tiere entweder wieder ihren Ausgangswerten oder pegelten sich auf den neuen Verhältnissen ein (Tab.11).

	S1		D2	
Tage p.i.	Albumine	γ-Globuline	Albumine	γ-Globuline
2	50,1	30,2	54,3	25,2
8	51,7	27,0	48,7	28,4
14	47,2	31,6	42,9	28,5
21	45,6	31,7	43,1	32,5
37	41,9	34,5	37,5	37,0
56	38,4	37,0	35,9	40,4
77	39,6	36,9	42,3	31,7

Tab.11: Beispielhafte Darstellung der Albumin- und γ- Globulin- Prozentwerte von S1 (Schwarzbuntes) und D2 (Dahomey- Rind) im Verlauf einer Reinfektion mit T. congolense

Die γ- Globulinpeaks liefen etwa parallel zu den maximalen Gesamteiweißwerten.
Der relative Anteil der α- und β- Globuline am Serumeiweiß der infizierten Rinder ist Tab.12 zu entnehmen. Veränderungen im Untersuchungszeitraum waren nicht stärker ausgeprägt als bei den Kontrolltieren. Die α- Globulinwerte reichten von 9% (S1) bis 17,6% (F2), bei den β- Globulinen betrug die Spanne 7% (F1) bis 15% (D1).

Versuchsrind	α- Globulin	β- Globulin
S1	9,0 - 13,3	10,6 - 11,3
S2	11,0 - 13,6	8,5 - 10,9
S3	13,6 - 16,2	10,4 - 13,6
D1	10,1 - 13,5	11,1 - 13,0
D2	9,8 - 15,1	11,1 - 15,0
D3	9,8 - 13,6	11,1 - 13,4
F1	12,3 - 14,2	7,0 - 10,4
F2	15,1 - 17,6	8,5 - 12,2
K1	10,9 - 15,7	9,6 - 11,4
K2	12,1 - 15,5	9,5 - 11,9

Tab.12: Prozentuale Verteilung der α- und β- Globulin-Fraktionen (Minima - Maxima) bei den infizierten Schwarzbunten (S), Dahomeys (D), Fleckvieh (F) und Fleckvieh- N'dama- Kreuzungen (F)

Durch Einbeziehung der Gesamteiweißwerte konnten die absoluten Konzentrationen in g/100 ml berechnet werden. Auch hier zeigten sich schon bei den Kontrolltieren erhebliche Schwankungen (Tab.13).

Kontrolltier	Albumin	α-Globulin	β-Globulin	γ-Globulin
S4	3,1-3,3	0,6-0,8	0,5-0,8	0,9-1,2
D4	2,4-2,9	0,7-1,0	0,7-0,9	1,6-1,9
F3	2,9-3,4	0,6-1,0	0,5-0,7	1,6-2,6
K3	3,0-3,3	0,7-0,8	0,7-0,8	1,6-2,0

Tab.13: Konzentrationen (g/100 ml) der Serumeiweißfraktionen (Minima - Maxima) bei den nicht infizierten Kontrollrindern der verschiedenen Rassen

Entsprechend streuten auch die Werte bei den Versuchstieren. Allerdings nahmen die γ- Globuline z.B.

bei S1 von minimal 1,74 auf maximal 2,58 g/100 ml
bei S2 von " 1,65 auf " 2,02 "
bei S3 von " 1,2 auf " 1,54 "
bei D1 von " 2,46 auf " 3,49 "
bei D2 von " 1,52 auf " 3,49 "
bei D3 von " 1,98 auf " 3,02 g/100 ml relativ kontinuierlich zu. Bei den Fleckvieh- und Kreuzungsrindern stiegen die γ- Globuline anfänglich gleichfalls an, ab der 4. Woche p.i. folgte ein Abfall zu den Ausgangswerten (K1) oder sogar darunter (F1, F2, K2); schließlich nahmen die Konzentrationen , besonders bei F1 und K2, wieder zu.

Neben den zahlenmäßigen Veränderungen der Eiweißfraktionen fielen qualitative Umstrukturierungen in den Eiweißprofilen auf. Bei den Schwarzbunten und Fleckviehrindern erfolgte die Zunahme der γ- Globuline breitbasig, während besonders D3, weniger ausgeprägt D1, D2, K1 und K2, schmalere γ- Globulinpeaks entwickelten; dieser Unterschied wurde besonders im 2. Monat p.i. deutlich (Abb.11).

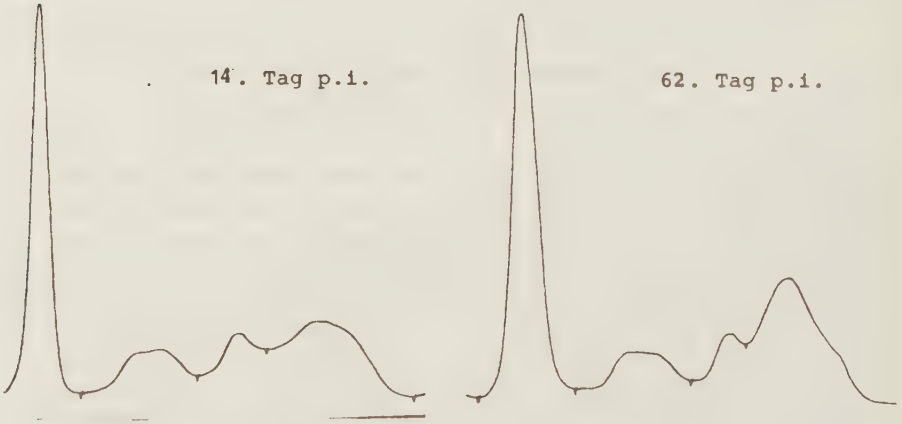

Abb.11: Pherogramme der Seren des erstinfizierten Dahomey- Rindes D3 vom 14. und 62. Tag p.i.

IV. Diskussion

Die Untersuchungen stellen einen Beitrag zur Aufklärung der Frage dar, ob das Phänomen "Trypanotoleranz" eine immunologische Ursache hat und welche Teilbereiche des humoralen Immungeschehens einbezogen sind. An den insgesamt 14 Versuchsrindern verschiedener Rassen wurden mit IFAT, ELISA, Immunpräzipitationen und Serumeiweißanalysen die IgM- und IgG- Antworten geprüft, wobei Antigenpräparationen mit unterschiedlichen Anteilen an somatischen und variantenspezifischen Antigenen zur Anwendung kamen.
GEISSELBRECHT (1983) untersuchte an denselben Tieren klinische Parameter; seine Beobachtungen bestätigten teilweise die Befunde von WEITZ (1970) sowie DARGIE und Mitarb.(1974), daß trypanotolerante Zwergrinderrassen - wie Dahomeys- in der Lage sind, Höhe und Dauer der Parasitämien zu begrenzen und dadurch einer Anämie entgegenzuwirken.

Für die Antikörpernachweise wurden Antigenpräparationen aus T.congolense- Stabilaten verwendet, die nicht kloniert waren, also eine Vielzahl von Varianzantigenen enthielten. Bei den Versuchstieren ließen sich daher einzelne, im Infektionsverlauf entstehende Trypanosomenvarianten serologisch nicht verfolgen. Es war dagegen möglich, mit derselben Antigencharge auch bei variantenspezifischen Tests über den gesamten Untersuchungszeitraum spezifische Antikörper nachzuweisen.

3 Antigenpräparate wurden hergestellt. Das IFAT- Antigen bestand aus fixierten, ganzen T.congolense. Das erste lösliche Antigen war ein Trypanosomenextrakt, enthielt also neben den Varianzantigenen noch somatische Antigene. Das andere lösliche Präparat wurde durch schonende Trypsinierung intakter Zellen gewonnen; es enthielt das N- terminale, varianzantigenspezifische Fragment der Oberflächenantigene (RAUTENBERG, REINWALD, RISSE, 1980).

Ausschließlich Antikörper gegen trypanosomale coat- Antigene wurden mit dem Trypsinierungsprodukt gemessen. Im ELISA gelang dabei nur die Bestimmung von IgM's. Dies stimmt mit Ergebnissen von MAKELA (1969) und SEED (1969 und 1972) überein, die VSA's für die IgM- Stimulation verantwortlich machten. IgG's werden dagegen

vorwiegend von common antigens induziert (WILSON, CUNNINGHAM,KIMBER, 1967; WILSON, 1969). Im ELISA repräsentierten die 3-4 IgM-peaks eines jeden Rindes folglich Primärantworten gegen aufeinanderfolgende Trypanosomenvarianten. Nach Trypanolyse werden dem Organismus z.T. konstante, C-terminale VSA- Determinanten zugänglich (CROSS,1980; BARBET und Mitarb.,1981) und lösen Antikörperbildung aus; es ist nicht ausgeschlossen, daß in meinem Test solche Antikörper miterfaßt wurden, die nicht gegen die variablen N-Termini der Oberflächenantigene gerichtet waren.

Im IFAT wurden von mir überwiegend Antikörper gegen common antigens und nur in geringem Maße solche gegen VSA's nachgewiesen, während NANTULYA und DOYLE (1977) bei gleicher Fixierungstechnik eine optimale Konservierung der coat- Antigene von T.brucei beschrieben. Die reine Variantenspezifität des Tests mußte in Frage gestellt werden, weil weder die Verwendung trypsinierter, noch die gepoolter T.congolense im IFAT zu gravierenden Titerunterschieden gegenüber "Impftrypanosomen" führte. Oberflächenfluoreszenz kann auch durch die Bindung von Antikörpern an nicht variable Membranantigene zustande kommen. Andererseits lassen sich die nach Trypsinierung kaum verringerten Titer mit unvollständiger Abspaltung der VSA's erklären; die kaum erhöhten Titer mit gepoolten Trypanosomen mochten ihre Ursache im Vorhandensein vieler, verschiedener VSA's in jeder Antigenpräparation haben. Einen deutlichen Beweis für den überwiegenden Nachweis gegen common antigens gerichteter Antikörper stellten schließlich die IgM- Titerverläufe dar. Alle Rinder bildeten im IFAT höchstens einen einzigen IgM- peak 2-3 Wochen p.i.. Bei VSA- spezifischen Antikörpern hätten mit jedem neuen Erscheinen der für Trypanosomeninfektionen typischen Varianten weitere peaks folgen oder die IgM- Titer solange wie im ELISA erhöht bleiben müssen.

Lösliches Extraktantigen von T.congolense enthielt, wie die SDS-Elektrophorese zeigte, neben vielen anderen Proteinen abgelöste VSA's. Wurden im ELISA mit Trypsinierungsprodukt also Antikörper gegen Varianzantigene und im IFAT vorwiegend solche gegen somatische Antigene nachgewiesen, erfaßte der ELISA mit Extraktantigen gleichermaßen Antikörper gegen VSA's und gegen common antigens.

IgM wurde im IFAT mit Anti- Fc- FITC- Konjugat bestimmt, das eine hohe Spezifität besitzt. Für alle anderen Konjugate konnten Kreuzreaktionen mit Immunglobulinen einer anderen Klasse nicht ausgeschlossen werden, da die markierten Antikörper jeweils auch gegen Determinanten der leichten Antikörperketten gerichtet waren.

Nachdem die Spezifitäten der verwendeten Techniken abgegrenzt waren, konnten die humoralen Immunantworten der im Versuch stehenden Rinder unter Berücksichtigung der 3 beschriebenen Antigenpräparationen verglichen werden auf Unterschiede in den Resttitern, im Erscheinen der ersten spezifischen IgM- und IgG- Antikörper, in den absoluten Maximaltitern, in den relativen Titerzunahmen, in Frühzeitigkeit und Stärke des Titerrückgangs ohne oder mit Behandlung sowie im Vorkommen präzipitierender Antikörper. Außerdem wurden Veränderungen der Serumgesamteiweißkonzentrationen und der Serumproteinfraktionen analysiert. Die Interpretation der Ergebnisse war erschwert durch die Heterogenität des Versuchstiermaterials. Im folgenden werden zunächst die Sekundärantworten der reinfizierten Rinder, anschließend die Primärantworten der erstmals beimpften abgehandelt.

Die schwarzbunten Rinder S1 und S2 hatten in allen Tests höhere Resttiter als die Dahomey- Tiere D1 und D2. Erste spezifische Antikörper der IgM- Klasse wurden im IFAT für S1 und S2 am 10. und 14. Tag p.i., für D1 und D2 am 7. Tag p.i. gemessen. Die IgG- Konzentrationen nahmen bei den Schwarzbunten jeweils 4 Tage später, bei den Dahomeys dagegen am selben Tag erstmals zu. WIESENHÜTTER (1969) registrierte im IFAT ab dem 14. Tag p.i. IgG- Anstiege gegen T.congolense, MEHLITZ (1978) ab dem 14.-28. Tag p.i.. WILSON und CUNNINGHAM (1972) wiesen ab dem 10.-20. Tag p.i. einen Anstieg von IgG- Titern nach. Demnach setzte die IgG- Produktion der Dahomeys vergleichsweise früh und ohne meßbare Verzögerung zur IgM-Bildung ein. IgM- Titerverläufe wurden bislang nicht beschrieben.

Im ELISA wurde bei den Schwarzbunten S1 und S2 mit Extrakt- Antigen schon am 3. Tag p.i. IgM- Neubildung nachgewiesen, bei den Dahomeys erst am 6. Tag p.i.; gegen das Trypsinierungsprodukt zeigten alle Rinder ab dem 6. Tag p.i. erhöhte Titer. Bei S1 und S2

bestand eine dreitägige Verschiebung zwischen beiden IgM- Bestimmungen; offensichtlich bildeten sie zunächst vorwiegend Antikörper gegen common antigens, dann gegen VSA's.
Die ersten IgG's traten im ELISA (Extraktantigen) bei den Schwarzbunten am 14. und 18. Tag p.i., bei D1 und D2 am 10. Tag p.i. auf. Dies entspricht Beobachtungen von LUCKINS (1977), der in Rindern gegen ein Trypanosomenhomogenat spezifische IgG's ab dem 7. - 14. Tag p.i. nachwies.

Besonders eindeutig unterschieden sich die Rassen in der Zeitdifferenz zwischen erster IgM- und IgG- Bildung. Sie betrug bei den Schwarzbunten im IFAT 4 und im ELISA 11-15 Tage, bei den Dahomeys im ELISA nur 4 Tage; im IFAT fielen erste IgM- und IgG- Anstiege bei D1 und D2 sogar auf denselben Tag.
TERRY und Mitarb.(1973) vermuteten, daß Trypanosomen in der Lage sind, über noch nicht näher definierte B- T- Zell- Interaktionen den IgM- IgG- Switch in ihren Wirten zu blockieren. Dies scheint, unter Berücksichtigung der IFAT- und ELISA- Spezifitäten, besonders auf die variantenspezifischen Antikörper der schwarzbunten Rinder zugetroffen zu sein, während die infizierten Dahomeys solchen Einflüssen eher entgingen. Nach JONES und CLARKSON (1974) entstehen bei T.vivax- infizierten Kälbern alle 2-5 Tage neue Trypanosomenvarianten. Ähnliche Zeitspannen sind für T.congolense anzunehmen; sie begrenzen die Wirksamkeit variantenspezifischer , protektiver Antikörper. Je verzögerter die Synthese VSA- spezifischer IgG's nach dem ersten IgM- Anstieg stattfindet, umso größer wird die Wahrscheinlichkeit, daß die Antikörper auf neugebildete Varianten mit ihnen unbekannten Antigendeterminanten treffen und damit für die Parasitenabwehr keine Bedeutung mehr haben. Sollten Dahomeys tatsächlich nicht nur gegen common antigens, sondern auch gegen die coat- Antigene rechtzeitig vor Antigenvariation spezifische IgG- Antikörper bilden können, gewännen sie dadurch in großem Ausmaß an Möglichkeiten, die Parasiten zu zerstören und die Parasitämien zu begrenzen.
Eine zweite Interpretationsmöglichkeit, zumindest für die IFAT-Titer der reinfizierten Rinder, ergibt sich unter Einbeziehung eines immunologischen Gedächtnisses der Tiere. Bei D1 und D2 fielen erste spezifische IgM- und IgG- Zunahmen auf denselben Tag;

bei S1 und S2 zeigten nur die IgG's einen deutlichen peak, wäh - rend die IgM- Titer kontinuierlich schwach erhöhte Titerschwankungen aufwiesen. Für eine gleichzeitige Synthese spezifischer IgM- und IgG- Antikörper ist die Beteiligung verschiedener Lymphozytenklone Voraussetzung. Es läßt sich dann vermuten, daß die IgG's der Dahomeys T- Zell- abhängig produziert wurden ; die am gleichen Tag gebildeten IgM müssen dagegen als Primärantwort gegen neues Antigen bewertet werden. Bei den Schwarzbunten folgte der Infektion zwar ebenfalls eine Aktivierung der memory- Zellen, meßbar an IgG- Anstiegen ohne vorherigen IgM- peak; eine eigentliche Primärantwort (IgM) gegen die neuen Parasiten blieb jedoch aus.

Die absoluten Maxima der IgG- Titer betrugen im IFAT für alle 4 Rinder 1:512; im ELISA erreichten S1, S2 und D1 als höchste Titerstufe 1:2048, D2 1:1024. Bei den IgM- Maximaltitern waren im IFAT die Dahomeys, im ELISA die Schwarzbunten leicht überlegen. Gemeinsam mit den höheren Resttitern der Schwarzbunten ergaben sich für die Dahomeys daraus geringfügig höhere, relative Titeranstiege. Dagegen beschrieb DESOWITZ (1959) für reinfizierte N'damas eine Hyperimmunreaktion mit viel höheren Antikörpertitern als bei nicht toleranten Rindern. BERNARD, HAASE und GUIDOT (1980) verglichen mit IFAT und ELISA die Antikörperantworten natürlich infizierter trypanotoleranter und -empfänglicher Rinder aus Obervolta. Sie untersuchten 1 Blutprobe pro Rind und fanden dabei keine signifikanten, rassebedingten Unterschiede in den IgG- Titern. Daher beurteilten sie die Fähigkeit der resistenten Rinder, die Parasitenzahl zu limitieren, als unabhängig von der Antikörperkonzentration. Unsere Ergebnisse bestätigten dies.

Größere Unterschiede wurden in den zeitlichen Verläufen der Antikörpertiter vor allem nach Parasitenelimination deutlich. Die Rinder S2 und D2 wurden am 44. Tag p.i., S1 und D1 am 101.Tag p.i. mit Berenil behandelt. Einige Tage danach stiegen im ELISA (Extraktantigen) die Antikörpertiter bei allen 4 Rindern kurzfristig um 1-2 Stufen an, bedingt durch das Freiwerden einer großen Vielfalt und Menge löslichen Antigens nach Zerstörung der Trypanosomen durch das Therapeutikum. Die Überschwemmung des Blutes mit

Antigen boosterte offenbar das Immunsystem des Wirts; starke Neusynthese spezifischer Antikörper war die Folge. Da nach Lyse der Parasiten den Rinderlymphozyten auch neue, teils variantenspezifische Antigendeterminanten demonstriert werden (PEARSON und Mitarb.,1981), kam es zur Produktion von IgG- und IgM- Antikörpern. In der mir bekannten Literatur wurden Titeranstiege nach Behandlung von Trypanosomeninfektionen nicht beschrieben.
Ausgehend von den posttherapeutischen Maxima fielen die Antikörpertiter bei den Schwarzbunten und Dahomeys mit unterschiedlicher Intensität wieder ab. Je höher die Resttiter der einzelnen Rinder zu Versuchsbeginn gewesen waren, umso länger waren nach der Behandlung erhöhte, spezifische Antikörper nachweisbar. Bei S2 nahmen trotz Berenilgabe am 44. Tag p.i. die IgM- und IgG- Konzentrationen noch um den 130. Tag p.i. zu. Allgemein hatten die reinfizierten Dahomeys und Schwarzbunten noch 150 Tage p.i. und 100 Tage nach der Therapie erhöhte IgG- und z.T. IgM- Titer. Bemerkenswert bleibt die Tatsache, das die Titer bei den Dahomeys generell schneller abfielen als bei den Schwarzbunten.
Eine lange Antikörperpersistenz bei Trypanosomeninfektionen wurde in der Literatur mehrfach beschrieben. DESOWITZ (1959) registrierte bei Rindern bis 100 Tage p.i. Maximaltiter und noch 2 Jahre p.i. erhöhte Antikörperkonzentrationen. In den Versuchen von MEHLITZ (1975) nahmen spezifische IgG erst über 200 Tage nach Selbstheilung, in denen von WIESENHÜTTER (1969) immerhin 40-80 Tage nach Berenilbehandlung wieder ab. MEHLITZ und DEINDL (1972) dagegen konnten eine Beeinflussung der Titer durch Berenil gar nicht feststellen. LUCKINS bestimmte im ELISA eine Antikörperpersistenz von 70-80 Tagen.
Es fällt schwer, dies Phänomen zu erklären. Die Geschwindigkeit des posttherapeutischen Titerabfalls richtet sich nach dem Entstehen von Antigen- Antikörper- Komplexen , nach den Halbwertszeiten von Antikörpern und Antigenen und nach den Ausscheidungsfunktionen des Organismus. Nach Ablauf der Halbwertszeiten können Titerzunahmen nur durch neue Antigenstimuli ausgelöst werden. Nach der Therapie waren allerdings keine Trypanosomen mehr im Blut nachzuweisen. Ein extravasales Vorkommen wird bisher für T.congolense ausgeschlossen (LOSOS und Mitarb.,1973). So kann nur in Blut

oder Gewebe eine Persistenz von Antigen vermutet werden, wie sie auch in anderen Systemen - weitgehend ungeklärt - auftritt. Eine andere Hypothese mag die kürzere Antikörperpersistenz der Dahomeys erklären: vielleicht stimmten diese Tiere ihre Antikörpersynthese so spezifisch auf das vorhandene Antigen ab, daß die Immunglobuline sich durch schnelle Antigenbindung dem Nachweis entzogen.

Die starke Oberflächenfluoreszenz mit Dahomey- Seren im IFAT ließ annehmen, daß diese Rinder vorwiegend Antikörper gegen coat- (und Membran-) Antigene bildeten. Die Fluoreszenz auch innerer Zellstrukturen nach Inkubation der fixierten Trypanosomen mit den Seren der Schwarzbunten deutete hingegen auf Antikörper gegen somatische Antigene hin. Es scheint möglich, daß die Dahomeys die Kontrolle über die Trypanosomen behalten, indem sie ihre Antikörper spezifisch gegen die Determinanten richten, die die verletzlichsten Zugänge zu den Parasiten darstellen.

Über die Diffusion der Rinderseren gegen Extraktantigen und gegen das Trypsinierungsprodukt sollten weitere Anhaltspunkte hierzu gewonnen werden. Es kommt dabei zum Ausfallen unlöslicher Antigen-Antikörper-Komplexe in einem Äquivalenzbereich, in dem weder Antigen noch Antikörper im Überschuß vorliegen. Präzipitierende Antikörper werden der Immunglobulinklasse G zugerechnet.
Zu allen Untersuchungszeitpunkten bildeten die Seren von S2 mit dem Extraktantigen bis zu 4 Präzipitationslinien; S1 reagierte geringfügig schwächer; dagegen fehlten präzipitierende Antikörper gegen coat- Antigene. Im Gegensatz hierzu entstand bei D1 und D2 nur an 1-2 Tagen je eine Präzipitationslinie gegen Extraktantigen; das Serum von D2 präzipitierte am selben Tag auch das Trypsinierungsprodukt. Demnach besaß zumindest D2 am 39. Tag p.i. spezifische IgG's gegen VSA's. Dagegen kann vermutet werden, daß die zahlreichen, von S1 und S2 gegen nicht variable Antigene der Trypanosomen synthetisierten Antikörper für die Parasitenabwehr von geringem Nutzen waren.
Es gibt unterschiedliche Interpretationsmöglichkeiten. Entweder bildeten S1 und S2 gar keine VSA-spezifischen IgG's (im IFAT und ELISA konnte mit Sicherheit nur das Vorhandensein von gegen das Trypsinierungsprodukt gerichteten IgM's nachgewiesen werden) oder

die auf einzelne Varianten passenden IgG's wurden zwar in großer Vielfalt, aber in so geringer Menge synthetisiert, daß es nicht zum Ausfallen von Immunkomplexen kommen konnte. Vermutlich vermochten die Dahomeys eine gezielte, effektive Antikörperantwort gegen wenige, prädominierende VSA's zu richten. Schließlich könnte auch gefolgert werden, daß Trypanotoleranz nicht eine schnellere Parasitenelimination, sondern eine Begrenzung der Variantenbildung im Wirt bedeutet.

Die Serumeiweißelektrophoresen gaben einen weiteren Hinweis auf die ausgeprägte Bildung einheitlicher Immunglobuline durch die Dahomeys. Im Verlauf der Infektion veränderte sich ihr γ- Globulinpeak von einer breit angelegten zu einer spitzen Form; bei S1 und S2 behielten hingegen die γ- Globuline trotz relativer Zunahme ihre Grundform bei. Ein schmaler, hoher γ- Globulinpeak ist typisch für eine Verringerung und damit Spezifizierung der immunglobulinbildenden Lymphozytenklone. Daß D1 und D2 eindeutige Ansätze hierzu zeigten, unterstützt die Hypothesen, die bei der Interpretation des Ouchterlony- Tests gemacht wurden. Der von DESOWITZ (1959) beschriebene "zusätzliche γ- Globulinpeak" nach Infektion von N'damas mit Trypanosomen entspricht vielleicht den von mir für die Dahomey-Rinder registrierten Veränderungen.
Die zahlenmäßigen Veränderungen der Eiweißfraktionen unterlagen bei beiden Rinderrassen starken, individuellen Schwankungen.Nach T. congolense- Infektion ließ sich dennoch eine deutliche Zunahme der γ- Globuline registrieren; dieselbe Beobachtung machten LUCKINS (1975), WELLDE und Mitarb. (1974) sowie VALLI und Mitarb. (1980). Gegenläufig zu den γ- Globulinwerten verhielten sich die Albumine; eine Albuminabnahme nach Trypanosomeninfektion beschrieben auch DESOWITZ (1960), GOODWIN und GUY (1973), WELLDE und Mitarb. (1974) sowie TABEL und Mitarb. (1980).
Die ß- Globuline schwankten bei D1 und D2 stärker als bei S1 und S2; bei D2 nahmen die Konzentrationen insgesamt sogar zu. Dies trat ebenfalls bei Versuchen von DESOWITZ (1960) und LUCKINS (1975) ein. VALLI und Mitarb.(1980) beobachteten dagegen gleichbleibende oder leicht abfallende ß- Globulinwerte bei T.congolense- Infektion. Die α-Globuline nahmen bei S1 und D2 zu, bei S2 und D1 war keine Regelmäßigkeit in den Schwankungen der Werte zu erkennen.

Unveränderliche α- Globulinkonzentrationen fand auch LUCKINS (1975); VALLI und Mitarb. (1980) bestimmten dagegen einen Anstieg.
Mit den Zunahmen der α- und β- Globuline scheint D2 am intensivsten unspezifische Abwehrfaktoren mobilisiert zu haben; als Rassemerkmal darf dies sicher nicht verstanden werden.

Die Gesamteiweißkonzentrationen verhielten sich wie die γ- Globuline, stiegen also im Verlauf der Reinfektionen an und lagen 157 Tage p.i. noch über den Ausgangswerten. Dies steht im Gegensatz zu den Untersuchungen von WELLDE und Mitarb.(1974), TABEL und Mitarb. (1980) sowie VALLI und Mitarb.(1980), die einen Abfall der Gesamteiweiße beobachteten.
Die zahlenmäßigen Veränderungen der Serumeiweiße ließen keine Rückschlüsse zu auf Fragen, die das Trypanotoleranzproblem betreffen.

Im bisherigen Teil der Diskussion wurden die Ergebnisse von reinfizierten Rindern besprochen. Im nun folgenden Vergleich der Antikörperantworten der erstinfizierten Rinder soll überprüft werden, ob besondere Reaktionen des humoralen Immunsystems trypanotoleranter Rinder erst durch wiederholten Antigenkontakt entstehen oder ob sie angeboren sind; Vererbbarkeit der Toleranz wurde von STEWART (1951), CHANDLER (1952), LETENNEUR (1978) und GRIFFIN und ALLONBY (1979) für Kreuzungen aus verschiedenen Rassen beschrieben, von MORTELMANNS und KAGERUKA (1976) jedoch verneint.

Klinisch hatten die Kreuzungsrinder - ähnlich den Dahomeys - mehr parasitenfreie Tage als Fleckvieh und Schwarzbunte. Im Zusammenhang mit der Krankheitsschwere bestätigten die serologischen Daten der erstinfizierten Rinder einige Befunde, die bei den reinfizierten erhoben wurden.

Wieder wiesen die Rinder mit dem geringsten zeitlichen Abstand zwischen IgM- und IgG- Bildung (D3, F2, K1) die schwächsten Krankheitserscheinungen auf. Die IgM stiegen bei S3 bereits am 6.-8. Tag p.i., bei den Fleckvieh- und Kreuzungstieren am 8.-10. Tagp.i. und bei D3 am 12.-14. Tag p.i. an. IgG's nahmen ab dem 10.-14. Tag p.i. zu. Innerhalb eines Tests (IFAT oder ELISA) betrug die Differenz zwischen erster IgM- und IgG- Bildung bei D3, F2 und K1

(Ausnahme: ELISA mit Extraktantigen) 0 Tage, bei F1 und K2 2 Tage und bei S3 4-7 Tage. Mit einer klinischen Erkrankung ging also nicht eine - absolut gesehen - spät einsetzende Antikörpersynthese einher, sondern eine im Verhältnis zur IgM- Bildung verzögerte IgG- Produktion.

Bei Fleckvieh, Kreuzungsrindern und S3 wurden Maximaltiter von 1:128-512 festgestellt; bei D3 reichten sie bis 1:1024. Ebenso unterschiedlich waren die relativen Zunahmen der IgM- (2-7 Titerstufen) und IgG- Konzentrationen (3-7 Stufen). Ein Zusammenhang zwischen Titerhöhe und Krankheitsresistenz ließ sich nicht feststellen. So erkrankte z. B. K2 sehr viel schwerer an der Trypanosomeninfektion als F2, obwohl beide in vergleichbarer Stärke IgM- und IgG- Antikörper produzierten.

Nur die IgM- Titerverläufe im IFAT verhielten sich bei allen erstinfizierten Rindern ähnlich; sie wurden durch Berenilbehandlung nicht beeinflußt. In allen anderen Tests variierte der Verlauf der Antikörperkonzentrationen bei den einzelnen Tieren stark. Nach den ersten 30-50 Tagen ließ sich aus den Veränderungen der Antikörper kein Rückschluß auf die zu erwartende klinische Erkrankung ziehen.
Besonders S3 und K2 entwickelten trotz sehr ähnlicher Titerverläufe ganz unterschiedliche Krankheitsbilder. Allerdings war zumindest bei den Fleckvieh- und Kreuzungsrindern ab dem 70.-80.Tag p.i. eine Aussage abzuleiten über die Fähigkeit der einzelnen Tiere, ihre Infektion zu beherrschen. Zu diesem Zeitpunkt stiegen bei F1 und K2, die schwer erkrankten, die Antikörperkonzentrationen kräftig an, während F2 und K1 gar nicht mehr oder nur noch geringfügig Antikörper synthetisierten. Bei letzteren wurde die Immunglobulinbildung offenbar kaum mehr stimuliert; schon der erste Antikörperschub hatte zur Kontrolle über die Parasiten geführt. Bei F1 und K2 hingegen muß erneute Trypanosomenvermehrung und Variantenbildung den neuen Antikörperanstieg ausgelöst haben. GEISSELBRECHT (1983) bestätigte dies durch den Nachweis von Parasitämiegipfeln. Weder bei den reinfizierten noch bei den erstmals angesteckten Tieren ließ sich eine Korrelation zwischen Parasitämie und Antikörpertiterverlauf finden, wie es WIESENHÜTTER (1972) gelungen war.

Präzipitationsversuche wurden nur mit den Schwarzbunten und Dahomeys durchgeführt. S3 und D3 hatten je eine Präzipitationslinie gegen Trypanosomenextrakt; diese war nur bei D3 als anti- VSA-Antikörper identifizierbar und trat schon am 16. Tag p.i. auf. Dies bestätigte eine frühe Bildung variantenspezifischer IgG's durch das trypanotolerante Rind.

Ebenfalls nur bei D3 bildete sich in der Serumeiweißelektrophorese ein sehr spitzer Immunglobulinpeak mit relativ schmaler Basis und stärkster Ausprägung am 63. Tag p.i.; alle anderen erstinfizierten Rinder hatten eine mehr oder weniger breitgestreute Immunglobulinsynthese. Somit entsprach D3 in der Qualität und Spezifität seiner Antikörper den reinfizierten Tieren D1 und D2 seiner Rasse.

Nach einer Normalisierung der durch die Umstallung der Fleckvieh- und Kreuzungstiere zu Versuchsbeginn erhöhten γ- Globuline stiegen die Werte bei den infizierten Rindern nochmals an, während sie bei den Kontrolltieren im Bereich physiologischer Schwankungen blieben. Im späteren Infektionsverlauf hatten nur F1 und K2 entsprechend ihrer erneut einsetzenden Antikörpersynthese starke γ- Globulinzunahmen um 0,4 g/100 ml. Bei schwachen γ- Globulinveränderungen blieben die Albuminkonzentrationen ziemlich konstant; nur bei starkem Anstieg der γ- Globuline kam es zu einem Albuminabfall.

ß- Globuline fielen bei S3 ab, bei den anderen Rindern bestand keine klare Tendenz. α- Globuline schwankten ebenso unregelmäßig; beim Fleckvieh und D3 stiegen sie bis zum Ende des Untersuchungszeitraums leicht an. Die scheinbare Widersprüchlichkeit der Literaturangaben über die Serumeiweißveränderungen nach Trypanosomeninfektion läßt sich wohl durch Individualität der Reaktionen erklären.

Gesamteiweiß nahm mit dem anfänglichen γ- Globulinpeak bei den Fleckvieh- und Kreuzungsrindern zu; die anschließend subnormalen Werte der infizierten Tiere lassen auf einen starken Verbrauch von Antikörpern durch Antigenbindung schließen. Erst nach Antikörpersynthese im Überschuß stiegen die Gesamteiweißkonzentrationen wieder an. Alle erstinfizierten Rinder erreichten bis zum Ende der Untersuchungszeit ihre individuellen Gesamteiweißnormen.

Allgemein konnten bei den infizierten Rindern weder von der absoluten Höhe der Antikörpertiter noch von ihrem ersten Anstieg Rückschlüsse auf die Schwere der klinischen Erkrankung oder den Infektionszeitpunkt gezogen werden. Während bisher überwiegend versucht wurde, bei trypanotoleranten Tieren das Vorhandensein besonders hoher Antikörperkonzentrationen zu beweisen (DESOWITZ, 1959; BERNARD, HAASE, GUIDOT, 1980), begünstigten diese bei den von mir untersuchten Rindern einen leichten Krankheitsverlauf nicht; im späten Infektionsstadium waren sie eher als schlechtes Zeichen im Sinne einer fehlenden Kontrolle über die Parasitenvermehrung zu bewerten. Eine klinische Erkrankung fiel regelmäßig mit starker Verzögerung der IgM- und IgG- Bildung und mit langer Antikörperpersistenz zusammen.
Von den erstinfizierten Rindern vereinigte einzig D3 Kennzeichen von Trypanotoleranz auf sich. Voll trypanosomenempfänglich waren die Rinder S3, F1 und K2; F2 und K1 vermochten die Infektion zu kontrollieren. Es ließ sich daher für die Fleckvieh- und Kreuzungsrinder keine einheitliche Aussage über ihre Trypanosomenempfänglichkeit machen. Aus den Versuchen konnte nicht beurteilt werden, wieweit individuelle Disposition oder ererbte Konstitution die Reaktionen des Immunsystems und die Krankheitsbilder der Tiere bestimmt haben. Unbeantwortet blieb ferner, wieweit die beschriebenen Besonderheiten der humoralen Immunantworten trypanosomenresistenter Rinder vielleicht als Folge zellulärer Immunreaktionen entstanden.

V. Zusammenfassung

10 Rinder verschiedener Rassen (3 Dahomeys, 3 Schwarzbunte, 2 N'dama- Fleckvieh- Kreuzungen und 2 Fleckvieh) wurden experimentell mit Trypanosoma congolense teils erst-, teils reinfiziert und ihre spezifischen IgM- und IgG- Antworten mit IFAT, ELISA und Immunpräzipitation verfolgt. Zur Differenzierung der Antikörperspezifitäten dienten 3 Antigenpräparationen, die sich in ihrer Zusammensetzung aus somatischem und variantenspezifischem Antigen unterschieden. Weiterhin wurden die Serumgesamteiweißkonzentrationen der Rinder bestimmt und ihre Serumproteine nach elektrophoretischer Auftrennung analysiert.

Eine Resistenz gegen die Trypanosomeninfektion trat bei erst- wie reinfizierten Dahomey- Rindern deutlich, bei Fleckviehkälbern und N'dama- Fleckvieh- Kreuzungen in unterschiedlichem Ausmaß auf; schwarzbunte Rinder blieben auch nach wiederholter Auseinandersetzung mit den Parasiten voll empfänglich.

Bei den Tieren mit schweren Krankheitssymptomen folgte auf die erste IgM- Synthese ein bis zu 15 Tagen verzögerter IgG- Anstieg; die Antikörper hatten breitgestreute Spezifität und waren vorwiegend gegen common antigens gerichtet. Klinisch nachgewiesene Trypanotoleranz dagegen wurde von schneller Aufeinanderfolge (0 - 4 Tage) auch varianzantigenspezifischer IgM- und IgG- Bildung begleitet. Diese Ergebnisse unterstreichen die Ansicht, daß Trypanosomen bei empfänglichen Wirten die Umschaltung der Antikörperproduktion von IgM auf IgG blockieren, während sie bei trypanotoleranten Rindern dazu nicht in der Lage sind.
Unabhängig von Resistenzeigenschaften verhielten sich die Antikörpertiterhöhen, ferner die synchronen Zunahmen von γ- Globulin- und Gesamteiweißkonzentrationen bei gleichzeitigen Albuminabnahmen, die bei allen Rinderrassen im Verlauf der Infektion nachzuweisen waren. Nach Berenilbehandlung fielen nur die variantenspezifischen IgM- Antikörper der Dahomey- Rinder innerhalb von 50 Tagen deutlich ab.

Willberg, G.: Serological investigations on cattle of various breeds experimentally infected with Trypanosoma congolense

Summary

Ten animals selected from various breeds of cattle (3 Dahomeys, 3 Friesians, 2 Simmentals, 2 N'dama- Simmental crossbreeds) were experimentally infected, partially reinfected, with Trypanosoma congolense. During the course of infection their IgM- and IgG responses were examined with IFAT, ELISA and immunoprecipitation as quantitative methods, using 3 antigen preparations which differed in the contence of somatic and variant specific antigen. More over alterations of the total serum protein concentrations as well as of the protein subclasses obtained by electrophoresis were analysed.

Newly infected and reinfected Dahomeys exhibited a high degree of resistance, Simmental cattle and N'dama- Simmental crossbreeds only a partial protection against the infection, whereas the Friesians remained susceptible even after repeated contact with the parasite.

Those animals which showed severe clinical symptoms developed a delayed IgG response up to 15 days after the primary IgM. Their antibodies were of low specificity and directed mainly against common antigens. In the clinically trypanotolerant animals, however, variant specific IgG could be detected already 0-4 days after the first IgM increase. These results support the hypothesis that in animals highly susceptible for an infection with T. congolense the switch from IgM to IgG secretion becomes inhibited whereas in trypanotolerant cattle the sequence remains normal. No correlation could be demonstrated between resistance against T. congolense and the absolute titre values of the total antibodies, the increase in the γ- globuline and the total serum protein and the decrease in the albumine concentrations which were observed in all infected animals. After treatment with Berenil only the variant specific IgM in Dahomey animals decreased significantly within 50 days.

VI. Literaturverzeichnis

Agabian, N., Thomashow, L., Milhausen, M., Stuart, K. (1980): Structural analysis of variant and invariant genes in trypanosomes. Am. J. trop. Med. Hyg. 29, 1043-1049

Allsopp, B.A., Njogu, A.R., Humphreyes, K.C. (1971): Nature of Trypanosoma brucei exoantigen and its relationship to 4 S antigen. Expl. Parasit. 29, 271-284

Ambroise- Thomas, P. (1976): Immunofluoreszenz in the diagnosis, therapeutic follow-up and sero-epidemiological studies of some parasitic diseases. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 70, 107-112

Ambroise- Thomas, P., P.T. Desgeorges (1978): Diagnostic immunoenzymologique (ELISA) des maladies parasitaires par une microméthode modifée. 1. Modalités techniques. Bull. Org. mond. Santé 56, 609-613

Ashcroft, M.T., E. Burtt, H. Fairbairn (1959): The experimental infection of some African wild animals with Trypanosoma rhodesiense, T.brucei and T.congolense. Ann. trop. Med. Parasit. 53, 147-160

Bangham, A.D., B.S. Blumberg (1958): Distribution of electrophoretically different haemoglobins among some cattle breeds in Europe and Africa. Nature 181, 1551-1552

Barbet,A.F., A.J. Musoke, S.Z. Shapiro, G. Mpimbaza, T.C. McGuire (1981): Identification of the fragment containing cross-reacting antigenic determinants in the variable surface- glycœprotein of Trypanosoma brucei. Parasitology 83, 623-637

Bofenschen, F. (1979): Versuche zur serologischen Differenzierung von Trypanosoma brucei, T.congolense und T.vivax. Vet. med. Diss, FU Berlin

Boreham, P.F.L. (1968): Immune reactions and kinin formation in chronic trypanosomiasis. Br. J. Pharmac. Chemother. 32, 493-504

Boreham, P.F.L., C.A. Facer (1975): Blood viscosity changes in rabbits infected with Trypanosoma brucei. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 69, 274

Boreham, P.F.L., C.A. Kimber (1970): Immune complexes in trypanosomiasis of rabbits. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 64, 168-169

Borst, P., A.C.C. Frasch, A. Bernards, J.H.J. Hoeijmakers, L.H.T. Van der Ploeg, G.A.M. Cross (1980): The genes for variant antigens in trypanosomes. Am. J. trop. Med. Hyg. 29, 1033-36

Bridgen, P.J., G.A.M. Cross (1976): N-terminal amino acid sequences of variant- specific surface antigens from Trypanosoma brucei. Nature 263, 613-614

Broom, J.C., H.C. Brown (1940): Studies in trypanosomiasis. IV. Notes on the serological characters of T.brucei after cyclical development in Glossina morsitans. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 34, 53-64

Brown, K.N., J. Williamson (1962): Antigens of brucei trypanosomes. Nature 194, 1253-1255

Camargo, M.E. (1966): Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of Trypanosoma cruzi in a slide test. Revta Inst. Med. trop. S. Paulo 8, 227-234

Chandler,R.L(1952): Comparative tolerance of West African N'dama cattle to trypanosomiasis. Ann. trop. Med. Parasit. 46, 127-134

Clarkson, M.J. (1968): Blood and plasma volumes in sheep infected with T.vivax. J. comp. Path. 78, 189-193

Clarkson, M.J., W.J. Penhale, R.B. McKenna (1975): Progressive serum protein changes in experimental infections of calves with T.vivax. J. comp. Path. 85, 397-410

Clarkson, M.J. (1976): Trypanosomes. Vet. Parasit. 2, 9-29

Cross, G.A.M. (1975): Identification, purification and properties of clone specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of Trypanosoma brucei. Parasitology 71, 393-417

Cross, G.A.M. (1977): Isolation, structure and function of variant specific surface antigens. Ann. Soc. belge Méd. trop. 57, 389-399

Cross, G.A.M. (1978): Antigenic variation in trypanosomes. Proc. R. Soc. Lond. B 202, 55-72

Cross, G.A.M., A.A. Holder, G. Allen, J.C. Boothroyd (1980): An introduction to antigenic variation in trypanosomes. Am. J. trop. Med. Hyg. 29, 1027-1032

Cunningham, M.P., K. Vickerman (1962): Antigenic analysis in the T.brucei group, using the agglutination reaction. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 56, 48-59

Cunningham, M.P., Bailey, N.M., C.D. Kimber (1967): The estimation of IgM immunoglobulin in dried blood, for use as a screening test in the diagnosis of human trypanosomiasis in Africa. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 61, 688-695

Dargie, J.D., P.K. Murray, M. Murray, W.R.T. Grimshaw, W.I.M.Mc Intyre (1978): Genetic resistance to Trypanosoma congolense: The responses of N'dama and Zebu cattle to experimental infection. Parasitology 77, XXXIV

Desowitz, R.S. (1959): Studies on immunity and host parasite- relationships. I. The immunological response of resistant and susceptible breeds of cattle to trypanosomal challenge. Ann. trop. Med. Parasit. 53, 292-313

Desowitz, R.S. (1960): Studies on immunity and host parasite- relationships. II. The immune response of antelope to trypanosomal challenge. Ann. trop. Med. Parasit. 54, 281-292

Desowitz, R.S. (1970): African trypanosomes. In: Jackson, G.J., R. Herman, J. Singer: Immunity to parasitic animals 2, 551-596. Appleton- Century- Crofts, New York

Doyle, J. (1977): Antigenic variation in the salivarian trypanosomes. Adv. Exp. Med. Biol. 93, 31-63

Edwards, E.E., J.M. Judd, F.A. Squire (1956): Observations on trypanosomiasis in domestic animals in West Africa. I. The daily index of infection and the weekly haematological values in goats and sheep infected with Trypanosoma vivax, T.congolense and T.brucei. Ann. trop. Med. Parasit. 50, 223-241

Engvall, E.,P. Perlmann (1972): ELISA III: Quantitation of specific antibodies by enzyme labeled anti- immunoglobulin in antigen- coated tubes. J. Immun. 109, 129-135

Esuruoso, G.O. (1976): The demonstration in vitro of the mitogenic effects of trypanosomal antigen on the spleen cells of normal, athymic and cyclophosphamide- treated mice. Clin. exp. Immunol. 23, 314-317

Fiennes, R.N.T.W. (1952): The cattle trypanosomiasis : A cryptic focus of parasites in association with a secondary stage of disease. Br. vet. J. 108, 298-306

Fiennes, R.N.T.W. (1970): Pathogenesis and pathology of animal trypanosomiasis. In Mulligan: The African Trypanosomes, 729-750, Allen and Unwin, London

Franke, E. (1905): Über Trypanosomentherapie. Münch. med. Wschr. 42, 2059-2060

Freeman, T., S.R. Smithers, G.A.T. Targett, P.J. Walker (1970): Specifity of immunoglobulin G in Rhesus monkeys infected with Schistosoma mansoni, Plasmodium knowlesi and Trypanosoma brucei. J. infect. Dis. 121, 401

Geißelbrecht, K.-H. (1983): Klinische Untersuchungen an experimentell mit Trypanosoma congolense infizierten Rindern verschiedener Rassen. Vet. med. Diss., München

Gidel, R. (1962): Etude électrophorétique quantitative en gélose des protéines sériques de bovins. Revue Elev. Méd. vet. Pays. trop. 15, 259-263

Godfrey, D.G., T.M. Leach, R. Killick- Kendrick (1964): Bovine trypanosomiasis in Nigeria. III. A high incidence in a group of West African humpless cattle. Ann. trop. Med. Parasit. 58, 204-215

Goodwin, L.G. (1970): The pathology of African trypanosomiasis. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 64, 797-817

Goodwin, L.G., M.W. Guy (1973): Tissue fluid in rabbits infected with Trypanosoma brucei. Parasitology 66, 499-513

Gray, A.R. (1960): Precipitating antibody in trypanosomiasis of cattle and other animals. Nature 186, 1058-1059

Gray, A.R. (1961): Soluble antigens of T.vivax and of other trypanosomes. Immunology 4, 253-261

Gray, A.R. (1965): Antigenic variation in a strain of Trypanosoma brucei transmitted by Glossina morsitans and Glossina palpalis. J. gen. Microbiol. 41, 195-213

Gray, A.R. (1967): Some principles of the immunology of trypanosomiasis. Bull. Wld. Hlth. Org. 37, 177-193

Gray, A.R., A.G. Luckins (1976): Antigenic variation in salivarian trypanosomes. In: Lumsden, W.H.R., D.A. Evans: Biology of the Kinetoplastidae. Academic Press, London

Greenwood, B.M. (1974): Possible role of a B- cell mitogen in hypergammaglobulinaemia in malaria and trypanosomiasis. Lancet I, 435-436

Griffin, L., E.W. Allonby (1979): Trypanotolerance in breeds of sheep and goats with an experimental infection of T.congolense. Vet. Parasit. 5, 97-105

Hajduk,S.L., K. Vickerman (1981): Antigenic variation in cyclically transmitted T.brucei. Variable antigen type composition of the first parasitaemia in mice bitten by trypanosome- infected Glossina morsitans. Parasitology 83, 609-621

Heidrich- Joswig, S., F. Hörchner (1981): Quantitative Methoden zur Bestimmung von Immunglobulinen und spezifischen Antikörpern beim Rind mit Trypanosomenbefall. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 94, 484-487

Hörchner, F., F. Bofenschen, B. Zander (1979): Zur serologischen Differenzierung von Trypanosoma brucei-, T.congolense- und T.vivax- Infektionen. Tropenmed. Parasit. 30, 265-273

Jenni, L. (1977): Comparisons of antigenic types of Trypanosoma brucei strains transmitted by Glossina m. morsitans. Acta trop. 34, 35-41

Jennings, F.W., P.K. Murray, M. Murray, G.M. Urquhart (1973): Protein catabolism in trypanosomiasis. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 67, 277

Jones, T.W., M.J. Clarkson (1974): The timing of antigenic variants of T. vivax. Ann trop. Med. Parasit. 68, 485-486

Kobayashi, I.A., I.R. Tizard (1976): The response to Trypanosoma congolense infection in calves. Determination of immunoglobulins IgG_1, IgG_2, IgM and C_3 levels and the complement fixing antibody titres during the course of infection. Tropenmed. Parasit. 27, 411-417

Kosinsky, R.J. (1980): Antigenic variation in trypanosomes: a computer analysis of variant order. Parasitology 80, 343-357

Lämmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature 227, 680-685

Lanham, S.M., D.G. Godfrey (1970): Isolation of salivarian trypanosomes of man and other mammals using DEAE- cellulose. Expl. Parasit. 28, 521-534

Lanham, S.M., E.R.A. Taylor (1972): Some properties of the immunogens (protective antigens) of a single variant of Trypanosoma brucei brucei. J. gen. Microbiol. 72, 101-116

Letenneur, L. (1978): Crossbreeding N'dama and Jersey cattle in Ivory Coast. Wld. Anim. Rev. 27, 36-42

Losos, G.J., J. Paris, A.J. Wilson, F.K. Dar (1973): Distribution of Trypanosoma congolense in tissues of cattle. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 67, 278

Lötzsch, R., G. Deindl (1974): Experimental infection in cattle. III. Indirect fluorescent antibody and complement fixation tests to measure serological responses. Expl. Parasit. 36, 27-33

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275

Luckins, A.G. (1972 a): Effects of x- irradiation and cortisone-treatment of albino rats on infections with brucei- complex trypanosomes. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 66, 130-139

Luckins, A.G. (1972 b): Studies on bovine trypanosomiasis. Serum immunoglobulin levels in Zebu cattle exposed to natural infection in East Africa. Br. vet. J. 128, 523-528

Luckins, A.G. (1974): Immunoglobulin response in Zebu cattle infected with T.cong. and T.vivax. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 68, 148-149

Luckins, A.G. (1975): Serum immunoglobulin levels and electrophoretic patterns of serum proteins in trypanosome- infected bushbuck. Ann. trop. Med. Parasit. 69, 337-344

Luckins, A.G. (1976): The immune response of Zebu cattle to infection with Trypanosoma congolense and T.vivax. Ann. trop. Med. Parasit. 70, 133-145

Luckins, A.G., D. Mehlitz (1976): Observations on serum immunoglobulin levels in cattle infected with T.brucei, T.vivax and T.congolense. Ann. trop. Med. Parasit. 70, 479-480

Luckins, A.G. (1977): Detection of antibodies in trypanosome- infected cattle by means of a microplate enzyme- linked immunosorbent assay. Trop. Anim. Hlth. Prod. 9, 53-62

Luckins, A.G.,D. Mehlitz (1978): Evaluation of an indirect fluorescent antibody test, enzyme- linked immunosorbent assay and quantification of immunoglobulins in the diagnosis of bovine trypanosomiasis. Trop. Anim. Hlth. Prod. 10, 149-159

Luckins, A.G., A.R. Gray, P. Rae (1978): Comparison of the diagnostic value of serum immunoglobulin levels, an enzyme- linked immunosorbent assay and a fluorescent antibody test in experimental infections with Trypanosoma evansi in rabbits. Ann. trop. Med. Parasit. 72, 429-441

Lumsden, W.H.R., W.J. Herbert (1967): Phagocytosis of trypanosomes by mouse peritoneal macrophages. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 61, 142

Mackenzie, A.R., P.F.L. Boreham, C.A.Facer (1973): Autoantibodies in African trypanosomiasis. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 67, 268

Makela, O., E. Ruoslahti, C. Ehnholm (1969): Subtypes of human ABO blood groups and subtypespecific antibodies. J. Immun. 102, 763-771

Mancini, G., A.L. Carbonara, J.F. Heremans (1965): Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry 2, 235-254

Mansfield,J.M., J.P. Kreier (1972): Autoimmunity in experimental T.congolense infections in rabbits. Inf. Immunity 5, 648-656

Matthyssens, G., S.F. Michiels, R. Hamers, E. Pays, M. Steinert (1981): Two variant surface glycoproteins of Trypanosoma brucei have a conserved C-terminus. Nature 293, 230-233

Mehlitz, D., G. Deindl (1972): Serological studies on cattle experimentally infected with African trypanosomes. Z. Tropenmed. Parasit. 23, 411-417

Mehlitz.,D.(1975): Serologische Untersuchungen zur Subgenus- Differenzierung und zur Antikörperpersistenz nach Trypanosomeninfektionen. Z. Tropenmed. Parasit. 26, 265-275

Morrison, W.I., M. Murray (1979): Trypanosoma congolense: Inheritance of susceptibility to infection in inbred strains of mice. Expl. Parasit. 48, 364-374

Mortelmanns, J., P. Kageruka (1976): Trypanotolerant cattle breeds in Zaire. Wld. Anim. Rev. 19, 14-17

Murray, P.K., F.W. Jennings, M. Murray, G.M. Urquhart (1974): The nature of immunosuppression in Trypanosoma brucei infections in mice. II. The role of T and B lymphocytes. Immunology 27, 825

Murray, M., W.I. Morrison, P.K. Murray, D.J. Clifford, J.C.M. Trail (1979): Trypanotolerance - a review. Wld. Anim. Rev. 31, 2-12

Musoke, A.J., V.M. Nantulya, A.F. Barbet, F. Kironde, T.C. Mcguire (1981): Bovine immune response to African trypanosomes: specific antibodies to variable surface glycoproteins of T. brucei. Paras. Immunol. 3, 97-106

Nantulya, V.M., J.J. Doyle (1977): Stabilization and preservation of the antigenic specifity of Trypanosoma brucei variant specific surface antigens by mild fixation techniques. Acta trop. 34, 313-320

Nantulya, V.M., A.J. Musoke, A.F. Barbet, G.E. Roelants (1979): Evidence for reappearance of Trypanosoma brucei variable antigen types in relapse populations. J. Parasit. 65, 673-679

Neal, R.A., P.C.C. Garnham, S. Cohen (1969): Immunization against protozoal disease. Br. med. Bull. 25, 194-201

Nielsen, K.J., J. Sheppard, W. Holmes, J.R. Tizard (1978): Experimental bovine trypanosomiasis. Changes in serum immunoglobulins, complement and complement components in infected animals. Immunology 35, 817-826

Ouchterlony, Ö. (1961): Diffusion- in- gel methods for immunological analysis II. Progr. Allergy 6, 30

Pagot, J. (1974): Les races trypanotolérantes. In: Control programs for trypanosomes and their vectors, Rev. Elev. Méd. vét. Pays. trop. 235-248

Pearson, T.W., S.K. Kar, T.C. Mcquire, L.B. Lundin (1981): Trypanosome variable surface antigens: studies using two- dimensional gel electrophoresis and monoclonal antibodies. J. Immun. 126, 823-828

Platt, K.B. (1976): Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for detecting Trypanosoma vivax in South American cattle Res. vet. Sci. 21, 53-58

Politzar, H. (1974): Serological studies on cattle experimentally infected with several species of African trypanosomes. Z. Tropenmed. Parasit. 25, 22-27

Raadt, P. de (1974): Immunity and antigenic variation: Clinical observations suggestive of immune phenomena in African trypanosomiasis. In: Ciba Foundation Symposium 20, 199-216 Elsevier North Holland, Amsterdam

Rautenberg, P., Reinwald, E., H.J. Risse (1980): Evidence for Concanavalin A binding sites on the surface coat of Trypanosoma congolense. Parasitology 80, 113-122

Rautenberg, P., E. Reinwald, H.J. Risse (1981): Sialic acids are responsible for charge heterogeneity of the variant surface glycoprotein of Trypanosoma congolense.
Molec. Biochem. Parasit. 4, 129-138

Reinwald, E., P. Rautenberg, H.J. Risse (1979): Trypanosoma congolense: Mechanical removal of the surface coat in vitro.
Expl. Parasit. 48, 384-397

Reinwald, E., P. Rautenberg, H.J. Risse (1981): Purification of the variant antigens of Trypanosoma congolense, - a new approach to the isolation of glycoproteins.
Bioch. biophys. Acta 668, 119-131

Richards, F.F., N.L. Rosen, M. Onodera, M.S. Bogucki, R.L. Neve, P. Hotez, M.Y.K. Armstrong, W.H. Konigsberg (1981): Antigenic variation and the surface glycoproteins of Trypanosoma congolense. Ref. Protozool. 5, 4656

Risse, H.J., E. Reinwald, P. Rautenberg (1980): Variant specific surface antigens of Trypanosoma congolense.
The Host Invader Interplay 1980

Ritz, H. (1914): Über Rezidive bei experimenteller Trypanosomiasis. II. Mitteilung. Arch. Schiffs- und Tropenhyg. 20, 397-420

Roberts, C.J., A.R. Gray (1973): Studies on trypanosome- resistant cattle. I. The breeding and growth performance of N'dama, Muturu and Zebu cattle maintained under the same conditions of husbandry. Trop. Anim. Hlth. Prod. 5, 211-219

Ruitenberg, E.J., J. Buys (1977): Application of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of human African trypanosomiasis (sleeping sickness).
Am. J. trop. Med. Hyg. 26, 31-36

Ruitenberg, E.J., F. van Knapen (1977): The enzyme- linked immunosorbent assay and its application to parasitic infections.
J. infect. Dis. 136, 268- 272, Suppl.

Sacks, D.L., M. Selkirk, B.M. Ogilvie, B.A. Askonas (1980):Intrinsic immunosuppressive activity of different trypanosome strains varies with parasite virulence. Nature 283, 476-478

Schindler, R.(1972): Untersuchungen über die Brauchbarkeit serologischer Verfahren für die Diagnose der Rindertrypanosomiasis in Afrika. Z. Tropenmed. Parasit. 23, 78-88

Schläppi, B., L. Jenni (1977): Studies on antigenic variation of cyclically transmitted Trypanosoma congolense. Acta trop. 34, 43-51

Seed, J.R., R.L. Cornille, E.L. Risby, A.A. Gam (1969): The presence of agglutinating antibody in the IgM immunoglobulin fraction of rabbit antiserum during experimental African trypanosomiasis. Parasitology 59, 283-292

Seed, J.R. (1972): Trypanosoma gambiense and T. equiperdum: Characterization of variant specific antigens. Expl. Parasit. 31, 98-108

Seed, J.R. (1974): Antigens and antigenic variability of the African trypanosomes. J. Protozool. 21, 639-646

Seed, J.R. (1977): The role of immunoglobulins in immunity to Trypanosoma brucei gambiense. Intern. J. Parasit.7, 55-60

Selkirk, M.E., D.L. Sacks (1980): Trypanotolerance in inbred mice: an immunological basis for variation in susceptibility to infection with Trypanosoma brucei. Tropenmed. Parasit. 31, 435-438

Stanley, H.A., B.M. Honigberg, I. Cunningham (1978): Analysis of the antigenic composition of T.b.brucei bloodstream and culture forms by the quantitative direct fluorescent antibody methods. J. Protozool. 25, 245-252

Stephen, L.E. (1966): Observations on the resistance of West African N'dama and Zebu cattle to trypanosomiasis following challenge by wild Glossina morsitans from an early age. Ann. trop. Med. Parasit. 60, 230-246

Stewart, J.L. (1951): The West African Shorthorn cattle: Their value to Africa as trypanosomiasis- resistant animals. Vet. Rec. 63, 454-457

Tabel, H., G.J. Losos, M.G. Maxie (1980): Experimental bovine trypanosomiasis (T.vivax and T.congolense). II. Serum levels of total protein, albumin, haemolytic complement, and complement component C 3. Tropenmed. Parasit. 31, 99-104

Tabel, H., M.G. Maxie, G.J. Losos, Ch.E. Minder (1981): Experimental bovine trypanosomiasis (T.vivax and T.congolense). III. Serum levels of immunoglobulins, heterophile antibodies, and antibodies to T.vivax. Tropenmed. Parasit. 32, 149-153

Takayanagi, T., G.L. Enriquez (1973): Effects of the IgG- and IgM-immunoglobulins in T. gambiense infections in mice. J. Parasit. 59, 644-647

Terry, R.J., J. Freemann, K.M. Hudson, J.A. Longstaffe (1973): Immunoglobulin M production and immunosuppression in trypanosomiasis: A linking hypothesis. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 67, 263

Terry, R.J. (1976): Innate resistance to trypanosome infections. In Lumsden and Evans: Biology of the Kinetoplastidae 1, 477-492 .Academic Press, London, New York.

Uilenberg, G., M. Giret (1972): Etudes immunologiques sur les trypanosomes. I. Existence d'un type antigénique de base chez une souche de Trypanosoma congolense. Rev. Elev. Méd. vét. Pays. trop. 25, 37-52

Valli,V.E.O., J.N. Mills, J.H. Lumsden, J.B. Rattray, C.M. Forsberg (1980): The quantitation of Trypanosoma congolense in calves. II. Biochemical changes. Tropenmed. Parasit. 31, 288-298

Van Meirvenne, N., P.G. Janssens, E. Magnus (1975): Antigenic variation in syringe passaged populations of Trypanosoma brucei. I. Rationalization of the experimental approach. Ann. Soc. belge Méd. trop. 55, 1-23

Verma, B.B., O.P. Gautam (1977): Studies on serum protein changes in experimental Trypanosoma evansi infection in buffalo calves. Indian vet. J. 54, 294-297

Vickerman, K. (1969): The fine structure of Trypanosoma congolense in its bloodstream phase. J. Protozool. 16, 54-69

Voller, A., D.E. Bidwell, A. Bartlett (1975) : A serological study on human Trypanosoma rhodesiense infections using a microscale ELISA. Tropenmed. Parasit. 26, 247-251

Voller, A., C. Draper, D.E. Bidwell, A. Bartlett (1975) : Microplate enzyme- linked immunosorbent assay for Chagas disease. Lancet I, 426-427

Voller, A., D.E. Bidwell, A. Bartlett (1976): Enzyme immunoassays in diagnostic medicine - theory and practice. Bull. Wld. Hlth. Org. 53, 55-65

Voller, A., D.E. Bidwell, A. Bartlett, R. Edwards (1977): A comparison of isotopic and enzyme immunoassays for tropical parasitic diseases. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 71, 431-437

Weitz, B.G.T. (1960): The properties of some antigens of Trypanosoma brucei. J. gen. Microbiol. 23, 589-600

Weitz, B.G.T. (1970): In Mulligan: Infection and resistance in the African trypanosomiases , 97-124, Allen and Unwin, London.

Wellde, B., R. Lötzsch, G. Deindl, J. Williams, G. Warin (1974): Trypanosoma congolense. I. Clinical observations of experimentally infected cattle. Expl. Parasit. 36, 6-19

Wery, M., P. van Wettere, S. Wery- Paskoff, N. van Meirvenne, M. Mesatewa (1970): The diagnosis of human African trypanosomiasis (T. gambiense) by the use of the fluorescent antibody test. 2. First results of field application. Ann. Soc. belge Méd. trop. 50, 711-730

Whitelaw, D.D., F.W. Jennings, P.H. Holmes, J.A. Mac Askill, G.M. Urquhart (1978): The trypanotolerant mouse. Parasitology 77, XXXVIII

Wiesenhütter, E. (1969): Untersuchungen über den diagnostischen Wert des indirekten Coons- Tests für Rindertrypanosomiasis nach Chemoprophylaxe. Tropenmed. Parasit. 20, 131-136

Wilson, A.J., M.P. Cunningham, C.D. Kimber (1966): Application of the indirect fluorescent antibody technique to bovine trypanosomiasis. East African Tryp. Res. Org. Annual Report,28

Wilson, A.J. (1969): Value of the IFAT as a serological aid to diagnosis of Glossina- transmitted bovine trypanosomiasis. Trop. Anim. Hlth. Prod. 1, 89-95

Wilson, A.J., Cunningham, M.P. (1971): Immunological aspects of bovine trypanosomiasis. IV. Patterns in the production of common antibodies. Trop. Anim. Hlth. Prod. 3, 133-139

Wilson, A.J., M.P. Cunningham (1972): Immunological aspects of bovine trypanosomiasis. I. Immune response of cattle to infection with Trypanosoma congolense and the antigenic variation of the infecting organisms. Expl. Parasit. 32, 165-173

Zwart, D., N.M. Perie, A. Keppler, E. Goedbloed (1973): A comparison of methods for the diagnosis of trypanosomiasis in East African domestic ruminants. Trop. Anim. Hlth. Prod. 5, 79-87.

Herrn Prof. Dr. Dr.h.c. J. Boch danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und die angenehmen Arbeitsbedingungen.

Mein Dank gilt weiter Herrn Prof. Dr. H.J. Risse und Herrn Dr. E. Reinwald für ihre freundschaftlichen Anregungen sowie die Durchführung der SDS- Elektrophoresen.

Herrn Prof. Dr. K. Tempel danke ich für die Möglichkeit zur Benutzung der Bestrahlungseinrichtungen.

Schließlich bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts, ganz besonders aber bei Frau Sabine Wegerdt, für ihre fachliche und menschliche Unterstützung bei der Arbeit.

LEBENSLAUF

Name:	Gudula Willberg
Geburtsdatum:	15.11. 1957
Geburtsort:	Bochum
Vater:	Friedrich Willberg, Bundesrichter
Mutter:	Elisabeth Willberg, geb. Neuhaus
1964 - 1967:	Grundschulbesuch in Bochum und Gelsenkirchen
1967 - 1972:	Besuch des Annette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasiums in Münster/ Westf.
1972 - 1975:	Besuch der Waldschule (Gymn.) in Berlin
1975 :	Abitur
1975 - 1981:	Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
Juli 1981 :	Staatsexamen
August 1981:	Approbation als Tierärztin
Aug.-Nov.81:	Famulatur an der Klinik und Poliklinik für Kleine Haustiere, Berlin
seit Dez.81:	Anfertigung der Dissertationsarbeit am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität München